

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Karolína Symerská

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Receptory modrého světla a jejich úloha
v citlivosti rostlin *Arabidopsis* k osmotickému
stresu**

Bakalářská práce

Karolína Symerská

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Karolína SYMERSKÁ**
Osobní číslo: **R18657**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Receptory modrého světla a jejich úloha v citlivosti rostlin Arabidopsis k osmotickému stresu**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Seznámení se s tématem bakalářské práce

Studentka se důkladně seznámí s náplní projektu bakalářské práce tak, aby byla schopna definovat základní cíle bakalářské práce, přístupy a metody, které bude při práci používat.

2. Shromáždění nejnovějších literárních zdrojů vztahujících se k tématu bakalářské práce a jejich zpracování

Zásadním zdrojem literatury, které si studentka musí prostudovat, jsou odborné články, a to především literatura týkající se problematiky klíčení semen a růstu rostlin vlivem světla, světelných signálních drah a odpovědí rostlin na abiotické stresy. Tyto práce pak budou sloužit jako další zdroje literatury.

3. Časová organizace a plán experimentů

Časová organizace experimentální práce vychází z plánu práce, který má studentka k dispozici od svého školitele.

4. Vlastní experimentální práce a dílčí analýzy výsledků

Studentka bude provádět experimenty podle plánu práce. Bude studovat klíčení semen a růst rostlin fotomorfogenických mutantů cry1-1, cry2-1, phot1, phot2, phot1/phot2 a ztl1 u Arabidopsis thaliana na zvolených koncentracích manitolu a v závislosti na světelných podmínkách.

5. Konečné zpracování výsledků

O každém experimentu bude studentka provádět záznamy do pracovního deníku a vypracuje protokol. Výsledky každého experimentu zpracuje do dílčích grafů a společně s vedoucím učiní z výsledků závěry. Všechny výsledky pak studentka postupně zpracuje do konečné výstižné podoby, aby byly připraveny k zakomponování do bakalářské práce.

6. Kompletace bakalářské práce

Se zpracováním bakalářské práce začne studentka s dostatečným předstihem, tedy nejpozději půl roku před plánovanou obhajobou bakalářské práce. Dílčí verze bakalářské práce bude diskutovat s vedoucím bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Taiz L., Zeiger E. (2010) Plant Physiology, 5th ed.

Taiz L et al. (2015) Plant Physiology and Development, 6th ed.

Jones R et al. (2013) The Molecular Life of Plants, 1st ed.

Buchanan BB et al. (2015) Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2nd ed.

Buchanan BB et al. (2010) Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 1st ed.

Odborné články v mezinárodních vědeckých časopisech týkající se problematiky bakalářské práce a podle doporučení vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.**
Laboratoř růstových regulátorů

Datum zadání bakalářské práce: **27. dubna 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2021**

L.S.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUČI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901

-2-

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolína Symerská
Název práce	Receptory modrého světla a jejich úloha v citlivosti rostlin <i>Arabidopsis</i> k osmotickému stresu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Klíčová slova	receptory modrého světla, abiotický stres, manitol, <i>Arabidopsis thaliana</i> , fotomorfogeneze
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Souhrn

Tato bakalářská práce se zaměřuje na roli receptorů modrého světla v citlivosti rostliny *Arabidopsis* k osmotickému stresu. Teoretická část se zabývá problematikou klíčení semen, reakcemi rostlin k abiotickému stresu a vlivu světla na růst a vývoj rostlin.

V experimentální části práce bylo zkoumáno zapojení receptorů modrého světla, CRY1 a CRY2, v reakci rostlin *Arabidopsis* na osmotický stres indukovaný manitolem. Pro experimenty byl vybrán recesivní mutant *cry1-1* odvozený od ekotypu Landsberg *erecta* (*Ler*) a recesivní mutant *cry2-1* odvozený od ekotypu Columbia (*Col*). Experimenty spočívaly v analýze klíčivosti semen a růstových reakcích rostlin při různé koncentraci manitolu v kultivačním médiu a v závislosti na světelných podmínkách (modré světlo, červené světlo a tma).

Z výsledků experimentů vyplývá, že oba kryptochromy, CRY1 i CRY2, jsou zapojeny v reakcích rostlin *Arabidopsis* na osmotický stres indukovaný manitolem. Jejich úloha se ovšem liší jak u jednotlivých rostlinných orgánů, tak za rozličných světelných podmínek.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Karolína Symerská
Title	Blue light receptors and their role in sensitivity of <i>Arabidopsis</i> plants to osmotic stress
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2022
Keywords	blue light receptors, abiotic stress, mannitol, <i>Arabidopsis thaliana</i> , photomorphogenesis
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

Summary

This bachelor thesis is focused on the role of blue light receptors in the sensitivity of *Arabidopsis* plants to osmotic stress. The theoretical part deals with the issue of seed germination, plant responses to abiotic stress and the effect of light on plant growth and development.

In the experimental part of this work, the involvement of blue light receptors, CRY1 and CRY2, in the response of *Arabidopsis* plants to osmotic stress induced by mannitol was investigated. A recessive mutant *cry1-1* derived from the ecotype Landsberg *erecta* (*Ler*) and a recessive mutant *cry2-1* derived from the ecotype Columbia (*Col*) were selected for the experiments. The experiments consist of analysis of seed germination and plant growth reactions at different concentrations of mannitol in the culture medium and depending on ambient light conditions (blue light, red light and darkness).

The results of the experiments show that both cryptochromes, CRY1 and CRY2, are involved in *Arabidopsis* plant responses to mannitol-induced osmotic stress. However, their role differs both for individual plant organs and under different light conditions.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování

Mé poděkování patří prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícný přístup a čas, který mi při vypracování bakalářské práce věnoval. Dále děkuji celé Skupině molekulární fyziologie, zejména Ing. Veronice Krbečkové, Ph.D., Mgr. Tereze Miksteinové a Bc. Janě Glogarové, za příjemné pracovní prostředí a veškeré rady při práci v laboratoři.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1	Klíčení a růst rostliny.....	3
3.2	Rostliny a stresové faktory.....	4
3.2.1	Odpověď rostlin na abiotický stres.....	5
3.3	Světelné signální dráhy	7
3.3.1	Signální dráhy červeného světla	9
3.3.2	Signální dráhy modrého světla	11
3.3.3	Fotoreceptory a klíčení	15
3.3.4	Fotoreceptory a abiotický stres.....	15
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Použité chemikálie a roztoky	20
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	21
4.4	Použité experimentální postupy	21
4.5	Použité vyhodnocovací postupy a zpracování výsledků.....	24
4.5.1	Studium klíčivosti semen.....	24
4.5.2	Studium růstových reakcí	24
5	VÝSLEDKY	26
5.1	Studium klíčivosti semen.....	26
5.1.1	Mutant <i>cry1-1</i>	26
5.1.2	Mutant <i>cry2-1</i>	29
5.2	Studium růstových reakcí	31
5.2.1	Elongace hypokotylu	31

5.2.1.1	Mutant <i>cry1-1</i>	31
5.2.1.2	Mutant <i>cry2-1</i>	32
5.2.2	Elongace kořene	34
5.2.2.1	Mutant <i>cry1-1</i>	34
5.2.2.2	Mutant <i>cry2-1</i>	36
6	DISKUZE.....	39
7	ZÁVĚR.....	43
8	LITERATURA.....	44

Seznam zkratek a symbolů

ABA	kyselina abscisová (abscisic acid)
<i>AsCRY1</i>	antisense- <i>BnCRY1</i>
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BL	modré světlo (blue light)
<i>BnCRY1</i> -OE	transgenní linie <i>Brassica juncea</i> nadměrně exprimující <i>CRY1</i> původem z <i>Brassica napus</i>
CBF faktor	C-repeat-binding factor
CCE doména	cryptochrome C-terminal extension doména
Col	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. ekotyp Columbia
COP1	constitutive photomorphogenesis 1 protein
<i>COR</i> geny	cold-related geny
CRY	krytochrom
<i>cry1-1</i>	recesivní mutant v genu <i>CRY1</i>
<i>CRY1-ovx</i>	transgenní rostliny nadměrně exprimující <i>CRY1</i>
<i>cry2-1</i>	recesivní mutant v genu <i>CRY2</i>
D	tma
DREB1s	drought response element binding factor 1
EIL1	ethylene insensitive 3-like 1 protein
EIN3	ethylene insensitive 3 protein
FAD	flavinadenindinukleotid
FADH•	flavosemichinon
FAD _{ox}	FAD v oxidovaném stavu
FKF1	flavin-binding kelch repeat F box protein
FMN	flavinmononukleotid
FR	dlouhovlnné červené světlo (far-red)
HIRs	reakce k vysokému ozáření (high-irradiance responses)
HO	hemoxidáza
HSP	heat shock protein

<i>HY4</i>	gen kódující CRY1
HY5	long hypocotyl 5
HY5-ABI5	long hypocotyl 5-ABA insensitive 5 regulon
J α -helix	proteinový region v blízkosti LOV2 domény
<i>Ler</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. ekotyp Landsberg <i>erecta</i>
LFRs	reakce k nízkému ozáření (low-fluence responses)
LHCB	light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein
LHCII	světlosběrný komplex II (light-harvesting complex II)
LKP2	LOV kelch protein 2
LOV	doména regulována světlem, kyslíkem nebo napětím (light, oxygen or voltage)
MDA	malondialdehyd
MES	kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová
MS médium	Murashige a Skoog médium
MTHF	methenyltetrahydrofolát
OST1	open stomata 1
<i>PCDI</i>	phytochrome chromophore-deficient mutant
P _{fr} / P _r	aktivní forma fytochromu / inaktivní forma fytochromu
PHOT	fototropin (phototropin)
PHR doména	photolyase-related doména
PIF	fytochrom-interagující faktor (phytochrome-interacting factor)
PSII	fotosystém II (photosystem II)
RL	červené světlo
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SbCRY1a	krytochrom 1a původem ze <i>Sorghum bicolor</i>
SPA1	suppressor of phyA-105 1 protein
STO	salt tolerance protein
TaCRY1a, TaCRY2	krytochrom 1 a 2 původem z <i>Triticum aestivum</i>
UVR8	UV resistance locus 8

VLFRs	reakce k velmi nízkému ozáření (very-low-fluence responses)
WT	divoký typ (wild-type)
ZTL	receptory Zeitlupe

Seznam obrázků

Obr. 1: Vývoj rostliny *Arabidopsis thaliana* v závislosti na světelných podmínkách.

Obr. 2: Rozdělení fotoreceptorů na základě absorpčních spekter.

Obr. 3: Fotokonverze fytochromů.

Obr. 4: Struktura kryptochromu.

Obr. 5: Struktura fototropinu.

Obr. 6: Grafy závislosti klíčivosti semen rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Landsberg *erecta* (*Ler*; A) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 7: Graf závislosti inhibice klíčivosti semen rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Landsberg *erecta* (*Ler*) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 8: Grafy závislosti klíčivosti semen rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (*Col*; A) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 9: Graf závislosti inhibice klíčivosti semen rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (*Col*) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 10: Grafy závislosti délky hypokotylu rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Landsberg *erecta* (*Ler*; A) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 11: Graf závislosti inhibice elongace hypokotylu rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Landsberg *erecta* (*Ler*) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 12: Grafy závislosti délky hypokotylu rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (*Col*; A) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 13: Graf závislosti inhibice elongace hypokotylu rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (*Col*) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 14: Grafy závislosti délky kořene rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Landsberg *erecta* (Ler; A) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 15: Graf závislosti inhibice elongace kořene rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Landsberg *erecta* (Ler) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 16: Grafy závislosti délky kořene rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col; A) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1*(B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

Obr. 17: Graf závislosti inhibice elongace kořene rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL).

1 ÚVOD

Rostliny jsou stejně jako jiné organismy ovlivňovány podmínkami okolního prostředí. Pokud jsou podmínky pro růst a vývoj rostliny nepříznivé, rostlina je ve stresu. Stresové faktory mohou být jak biotické, tak abiotické. Mezi abiotické stresy patří například příliš nízká nebo vysoká teplota, přílišné či nedostatečné osvětlení, přebytek nebo nedostatek vody či zasolení. Jelikož jsou rostliny organismy sesilní a nemohou stresovým faktorům uniknout, musí se jim přizpůsobit.

Světlo hraje zásadní roli v životě rostlin. Neslouží pouze jako zdroj energie při fotosyntéze, ale rovněž jako signál uplatňující se při morfogenezi. Díky těmto signálním drahám se rostliny dokážou přizpůsobovat měnícím se světelným podmínkám prostřednictvím fotomorfogeneze a skotomorfogeneze. Pro příjem světelného signálu rostliny využívají fotoreceptory. Fotoreceptory jsou specializované pro vnímání světla rozličné vlnové délky: červené světlo a dlouhovlnné červené světlo vnímají fytochromy, modré světlo a ultrafialové záření A vnímají kryptochromy, fototropiny a receptory patřící do skupiny ZTL / FKF1 / LKP2 a ultrafialové záření B vnímá fotoreceptor UVR8.

Sucho a zasolení (salinita) půdy patří mezi nejzávažnější problémy v zemědělství po celém světě. Salinita půdy je způsobena vyšší koncentrací iontů, ke které dochází přirozeně (např. mořské pobřeží), ale i činností člověka – posypové soli či nevhodné hnojení. Meziročně se zasolování zemědělských půd zvyšuje o 10 %. Předpokládá se, že do roku 2050 bude polovina orné půdy ovlivněna zasolením. Zasolení způsobuje osmotický stres, a tím kořeny rostlin ztrácí schopnost přijímat vodu a ionty. Dochází tak ke snižování výnosů plodin.

Jednou z možností, jak porozumět mechanismům, kterými rostliny zvládají abiotický stres včetně zasolení, je studium fotoreceptorů a jejich úlohy v citlivosti rostlin na stresové podmínky. Tato poznání pak mohou vést k dosažení dlouhodobě udržitelného zemědělství a ke zvýšení výnosu plodin.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se problematiky klíčení semen a růstu rostlin v závislosti na světelných podmínkách, světelných drah a odpovědi rostlin na abiotické stresy.

V experimentální části práce bylo cílem analyzovat vliv receptorů modrého světla na citlivost rostlin *Arabidopsis* k osmotickému stresu indukovaného manitolem prostřednictvím studia klíčení semen a růstu rostlin fotomorfogenních mutantů *cry1-1* a *cry2-1*.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Klíčení a růst rostliny

Na počátku celého životního cyklu rostliny je semeno. Hlavní rolí semene je ochrana embrya a zároveň správné načasování klíčení na základě environmentálních podmínek tak, aby rostlina byla schopna dokončit životní cyklus (Carrera-Castaño *et al.*, 2020). Vývoj semene u rostliny *Arabidopsis thaliana* lze rozdělit do tří fází. Po dvojitém oplození v zárodečném vaku nastává časná morfogeneze a řadou buněčných dělení dostává embryo základní podobu rostliny. V první fázi vývoje je v semeni nízký obsah lipidů, ale zato se akumuluje potřebné množství škrobu. Ve druhé fázi (fázi zrání) prudce vzrůstá hmotnost sušiny. Akumuluje se velké množství zásobních olejů a proteinů, ke konci druhé fáze mohou tyto látky představovat až 40 % sušiny. Ve třetí fázi (fázi pozdního zrání) dochází ke ztrátě vody. Toto je nutné pro zachování životnosti semene během období dormance či tzv. quiescence (Baud, 2002). Zralé semeno je suché a nazývá se tzv. quiescentní. Takové semeno má nízký obsah vlhkosti (5–15 %) a jeho metabolická aktivita je téměř nulová. V tomto stavu dokáže semeno přetrvat i po dobu několika let.

Klíčení začíná příjmem vody (imbibice) suchým semenem, což vede k aktivaci metabolických drah a ke konečnému proražení semenných obalů (ať už se jedná o endosperm, perisperm, testu či perikarp) prodlužujícím se kořínkem (radikulou). Klíčení je tedy proces od příjmu vody po proražení semenných obalů. Samotné klíčení lze rozdělit do tří fází. V první fázi probíhá již zmiňovaný příjem vody. Ve druhé fázi se aktivuje metabolická aktivita a respirace. Během pár hodin po hydrataci začíná transkripce genů potřebných při klíčení a jejich translace do proteinů. Ve třetí fázi dochází k obnovení příjmu vody v důsledku snížení vodního potenciálu. Zároveň se mobilizují zásobní látky (Bewley *et al.*, 2012; Taiz *et al.*, 2015).

Klíčení rostliny je ovlivňováno mnoha faktory, mezi které patří například množství vody, teplota, intenzita osvětlení, koncentrace aniontů v půdě (nitráty a nitrity) či dostupnost živin (Taiz *et al.*, 2015; Carrera-Castaño *et al.*, 2020). Dále se na regulaci klíčení podílejí rostlinné hormony jako kyselina abscisová (ABA), gibbereliny, ethylen, auxin, cytokininy či brassinosteroidy. ABA klíčení ovlivňuje negativně, např. koncentrace 1–10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ABA dokáže inhibovat klíčení u *Arabidopsis*. Inhibice je způsobena zpomalováním prodlužování

radikuly, oslabováním endospermu či zvýšením exprese transkripčních faktorů, které nepříznivě ovlivňují klíčení. Naopak gibereliny, ethylen, cytokininy a brassinosteroidy působí jako antagonisti vůči ABA, a tím pozitivně působí na klíčení. Gibereliny mohou ukončit dormanci semene, aktivovat endosperm či se podílejí na růstu embrya. Aby embryo mohlo čerpat zásobní látky z endospermu, musí dojít k jeho hydrolytickému rozkládání. Gibereliny stimulují syntézu hydroláz jako je např. α -amyláza, β -glukanáza či proteázy. Brassinosteroidy a auxin stimulují produkci ethylenu. Gibereliny, brassinosteroidy a ethylen mohou indukovat klíčení narušením testy a endospermu, přičemž inhibují účinky ABA. Samotný auxin se na klíčení příliš nepodílí, nicméně ve spolupráci s gibereliny a ethylenem může klíčení ovlivňovat. Cytokininy mimo jiné kontrolují velikost semene, včetně růstu embrya, endospermu a osemení (Miransari *et al.*, 2014).

3.2 Rostliny a stresové faktory

Rostliny žijí v neustále se měnících podmínkách. Podmínky, které rostlinám umožňují dosáhnout maximální růstový (výška a váha) a reprodukční (množství semen) potenciál, se označují jako ideální. Naopak negativní environmentální vlivy, které rostliny závažným způsobem ohrožují, se nazývají stresové faktory (stresory). Stav, ve kterém se rostliny nachází pod vlivem stresorů, se poté označuje jako stres. Zvládání stresu rostlin komplikuje i jejich přisedlý způsob života, kdy rostliny nemohou před stresory uniknout (Procházka *et al.*, 1998; Taiz *et al.*, 2015)

Stresové faktory lze rozdělit biotické a abiotické. Biotický stres je způsobený negativními interakcemi dalších živých organismů s rostlinou. Mezi tyto organismy patří například bakterie, viry, houby, hmyz, hlístice či dokonce jiné rostliny (plevelé). Abiotický stres zahrnuje jak fyzikální, tak chemické faktory. Mezi tyto faktory patří například nadměrná nebo nedostatečná intenzita osvětlení, extrémní teplota (horko, chlad, mráz), nedostatek či nadbytek vody, zasolení, nedostatek živin nebo přítomnost toxických látek (Taiz *et al.*, 2015; Zhu, 2016; Gull *et al.*, 2019).

Schopnost rostlin tolerovat stres závisí na intenzitě stresu, době, množství a kombinaci působení stresových faktorů a rovněž na konkrétním orgánu, typu pletiva, genotypu a stádiu vývoje rostliny, na který stresor působí (Gaspar *et al.*, 2002).

Pokud se odpověď individuální rostliny na stres (tj. morfologické a fyziologické změny) s opakovaným působením daných stresorů na rostlinu zlepšuje, poté hovoříme o aklimatizaci. V tomto případě se nemění genetický kód, exprese specifických genů se děje pomocí epigenetických mechanismů. Změny jsou zpravidla vratné. Pokud dojde k fixaci genetických změn v celé populaci a jsou děděny napříč generacemi, hovoříme o adaptaci. Adaptace je výsledkem přirozeného výběru (Taiz *et al.*, 2015).

3.2.1 Odpověď rostlin na abiotický stres

Primární odpovědí rostlin na stres je exprese specifických stresem-indukovaných proteinů. Tyto proteiny lze rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny patří proteiny, které se přímo podílí na ochraně rostliny vůči danému stresu. Jedná se zejména o proteiny zabraňující dehydrataci rostlinné buňky, chaperony, detoxifikační enzymy apod. Do druhé skupiny patří proteiny regulující genovou expresi a transdukcí signálů. V tomto případě se jedná o transkripční faktory či proteinkinázy. Poté následují specifické biochemické a fyziologické reakce (Hirt *et Shinozaki*, 2004).

Záření

Rostliny mohou být stresovány jak nedostatkem, tak i nadbytkem světelného záření. Na nedostatek světla rostliny většinou reagují zvyšováním množství světlosběrného komplexu II (LHCII, light-harvesting complex II) ve fotosystému II (PSII), zvětšováním anténního komplexu či zvyšováním počtu reakčních center v PSII. Tím se zlepší zachytávání záření a přenos energie. Pokud jsou rostliny adaptované na stín vystaveny přílišnému záření, dochází k přetížení systému reakcí sekundární fáze fotosyntézy nadbytečnou sluneční energií. Místo toho, aby se energie spotřebovávala na syntézu sacharidů, dochází k syntéze reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou poškodit buňky (Taiz *et al.*, 2015).

Teplota

Vysoká teplota je jedním z hlavních abiotických stresových faktorů, který ovlivňuje růst, metabolismus i výnosnost rostlin po celém světě. Toleranci rostlin k vysoké teplotě ovlivňuje nejen délka působení teploty a její stupeň, ale závisí i na druhu rostliny (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Teplota může ovlivnit strukturu biomakromolekul jako je DNA, RNA nebo proteiny, což vede ke změně jejich aktivity či funkce. Teplota také ovlivňuje tekutost membrány a může ovlivnit aktivitu proteinů s membránou asociovaných

(Vu *et al.*, 2019). Při vysokých teplotách je důležitá role tzv. heat shock proteinů (HSPs). Vysoká teplota negativně ovlivňuje správné skládání proteinů. HSPs tyto špatně poskládané proteiny detekují, čímž umožňují zahájení dalších opravných mechanismů (Lamers *et al.*, 2020).

Chlad či mráz je pro rostliny velkým rizikem. Nízké teploty způsobují rychlé tuhnutí lipidové dvojvrstvy v membránách, zpomalování enzymatických reakcí či později nerovnováhu fotosyntézy, respirace a hromadění toxických látek v buňce. Dalším problémem je vytváření ledových krystalů v buňkách, které je mohou vážně poškodit (Buchanan *et al.*, 2015). U *Arabidopsis* je do signální dráhy vnímání chladu zapojen CBF faktor (C-repeat-binding factor) a OST1 (open stomata 1), což je serin/threonin kináza důležitá v signální dráze kyseliny abscisové. OST1 pozitivně reguluje toleranci vůči chladu (Ding *et al.*, 2015).

Sucho, zasolení a osmotický stres

Vodní deficit a zasolení jsou stresové faktory, které mohou vést k dalšímu stresu, a to osmotickému. Vodní deficit vyvolává zavírání průduchů, snižování turgoru, snižování výměny plynů v listech a snižuje rychlost fotosyntézy. Zasolení může mít až cytotoxický účinek, způsobený akumulací iontů, zejména Na^+ a Cl^- . Vysoké koncentrace iontů vedou k denuraci proteinů, inhibici fotosyntézy a dalších procesů. K inhibici fotosyntézy dochází akumulací Na^+ v listech. Za normálních podmínek je v rostlinných buňkách osmotický tlak vyšší než v půdním roztoku. Rostliny tento tlak využívají pro příjem vody a živin kořeny. Při osmotickém stresu způsobeném zasolením je v buňkách nižší osmotický tlak než v okolí, kořeny ztrácí schopnost přijímat vodu a ionty jako K^+ a Ca^{2+} (Kader *et al.*, 2010). Rostliny mohou reagovat na stres zasolením třemi způsoby. Prvním způsobem je tolerance k osmotickému stresu. Při slabší reakci na osmotický stres nedochází k přílišné redukci růstu listů a omezení funkce průduchů, nicméně tento způsob je výhodný pouze při dostatečné dostupnosti vody. Druhým způsobem je vylučování Na^+ z buněk. To zabrání akumulaci Na^+ v listech, která by vedla k toxickým účinkům. Třetí způsob zahrnuje toleranci pletiv k naakumulovaným iontům Na^+ či Cl^- . To vyžaduje ukládání iontů do apoplastu či vakuoly. Mimo to dochází k syntéze a akumulaci kompatibilních rozpuštěných látek, osmolytů. Osmolyty jsou osmoticky aktivní organické látky, které ovšem nedestabilizují membrány či nenarušují enzymatickou aktivitu jako ionty. Mezi osmolyty patří např. prolin či sacharidy (Procházka *et al.*, 1998; Munns *et al.*, 2008; Carillo *et al.*, 2011; Taiz *et al.*, 2015).

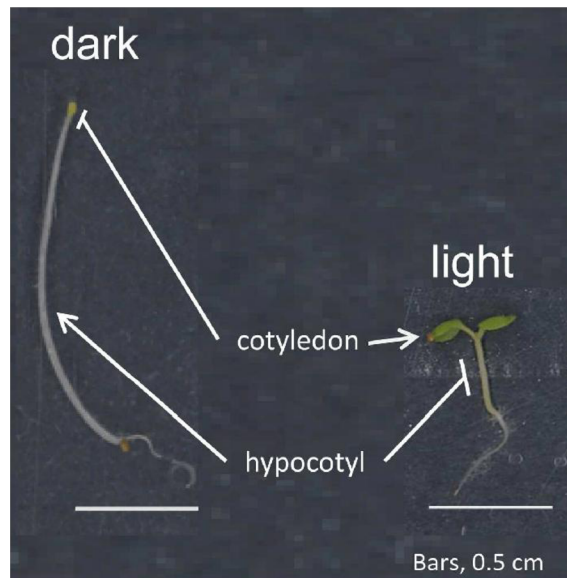
Nadbytek vody

Opak stresu ze sucha, nadbytek vody, je pro rostliny rovněž nebezpečný. Zamokření snižuje výměnu plynů a snižuje rychlost fotosyntetických reakcí. To obvykle vede k nedostatku kyslíku (hypoxii), snížení respirace, a tím dochází k narušení energetické rovnováhy. V buněčných membránách se začne hromadit ethylen. Prostřednictvím transkripčních faktorů EIN3 (ethylene-insensitive 3) a EIL1 (ethylene-insensitive 3-like 1), dochází k aktivaci adaptivních reakcí, např. prodlužování stonku, hyponastii listů či tvorbu adventivních kořenů (Sasidharan *et Voeselek*, 2015; Lamers *et al.*, 2020).

3.3 Světelné signální dráhy

Světlo je elektromagnetické záření, které má vlnový i částicový charakter. Vlnová složka se skládá z elektrického a magnetického pole, které oscilují v rovinách na sebe kolmých. Částicový charakter je představován fotony. Ty nesou určitou energii – světelné kvantum. Elektromagnetické záření lze charakterizovat veličinami vlnová délka (λ) a frekvence (ν). Frekvence udává počet kmitů za 1 sekundu. Vlnová délka udává nejmenší vzdálenost dvou bodů kmitajících ve stejné fázi, jednotkou je nm (10^{-9} m). Čím je kratší vlnová délka, tím je vyšší energie fotonu (Pavlová, 2005; Taiz *et Zeiger*, 2010).

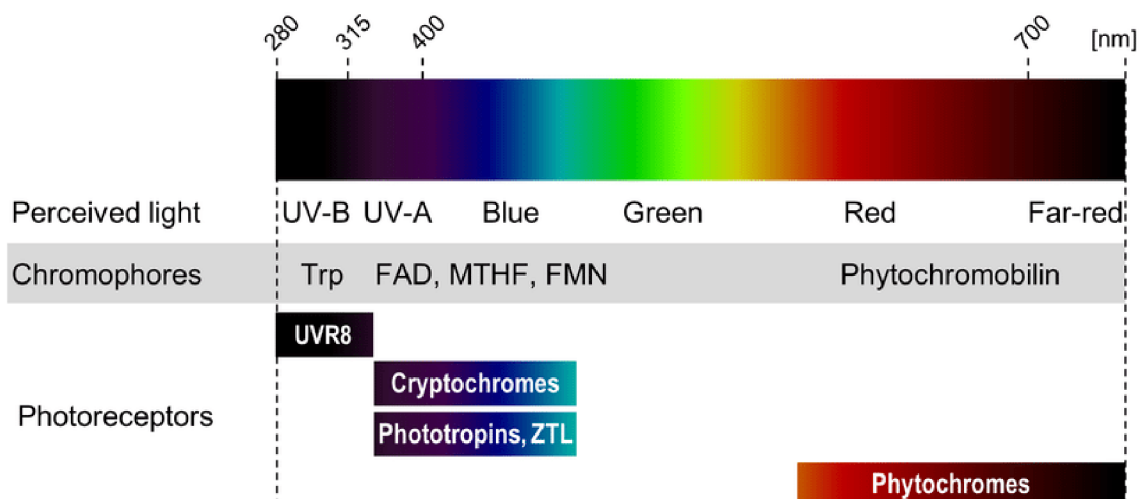
Světelné záření hraje klíčovou roli ve vývoji rostlin. Světlo neslouží pouze jako zdroj energie při fotosyntéze, kdy rostliny využívají záření ve viditelné části spektra (rozmezí vlnové délky 400–700 nm), ale i jako signál uplatňující se při morfogenezi (Pavlová, 2005; Paik *et Huq*, 2019). V případě, že vývoj rostliny probíhá ve tmě (skotomorfogeneze), dochází k prodlužování hypokotylu, vytváří se apikální háček, chloroplasty jsou nahrazeny etioplasty a nejsou přítomné pigmenty chlorofyl a antokyan. Zároveň je utlumena exprese světlem regulovaných genů. Děje související s růstem a vývojem rostlin za přítomnosti světla se nazývá fotomorfogeneze (viz Obr. 1). Po vystavení rostliny světlu dochází k deetiolizaci. Prodlužování hypokotylu je inhibováno, začíná syntéza chlorofylu a expanze děložních lístků (kotyledonů). Expres genů regulovaná světlem se zvyšuje až stonásobně (Chory, 1992; Alabadí *et al.*, 2004).



Obr. 1: Vývoj rostliny *Arabidopsis thaliana* v závislosti na světelných podmínkách. Při skotomorfogenezi (vlevo) dochází k prodlužování hypocotylu a rostlina je téměř bez pigmentace. Při fotomorfogenezi (vpravo) dochází k expanzi kotyledonů, syntéze chlorofylu a k inhibici prodlužování hypocotylu (převzato z Montgomery, 2016).

Pro příjem signálů v podobě záření rostliny využívají proteiny reagující na světlo, fotoreceptory. Tyto receptory jsou specializované pro vnímání záření o určité intenzitě, kvalitě, směru a doby působení (Christie *et al.*, 2015). Zároveň dokážou rozlišit specifickou vlnovou délku, děje se tak díky přítomnosti prostetické skupiny nebo chromoforu v podobě tryptofanu (D'Amico-Damião *et Carvalho*, 2018).

Červené světlo (600–700 nm) a dlouhovlnné červené světlo (far-red light; 700–750 nm) jsou vnímány fytochromy. Modré světlo a ultrafialové záření A (315–500 nm) vnímají kryptochromy (CRYs), fototropiny (PHOTs) a receptory patřící do skupiny ZTL / FKF1 / LKP2. Fotoreceptor UVR8 (UV resistance locus 8) pak vnímá ultrafialové záření B (280–315 nm) (Christie *et al.*, 2015; D'Amico-Damião *et Carvalho*, 2018). Přehled základního rozdělení fotoreceptorů je na Obr. 2.



Obr. 2: Rozdělení fotoreceptorů na základě absorpčních spekter. UVR8 vnímá ultrafialové záření B (UV-B), chromoforem je tryptofan (Trp). Kryptochromy, fototropiny a Zeitlupe (ZTL) vnímají modré světlo, chromofory jsou FAD (flavinadenindinukleotid), MTHF (methenyltetrahydrofolát) nebo FMN (flavinmononukleotid). Fytochromy vnímají červené světlo, chromoforem je fytochromobilin (převzato z Tilbrook *et al.*, 2013).

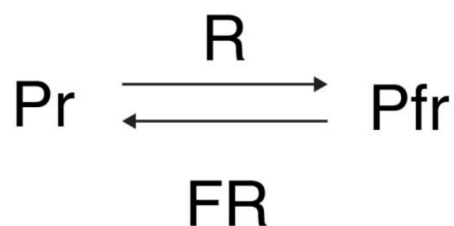
3.3.1 Signální dráhy červeného světla

Fytochromy

Jak již bylo řečeno dříve, červené světlo a dlouhovlnné červené světlo absorbují fytochromy. Fytochromy se nevyskytují pouze u rostlin, ale i u zelených řas, cyanobakterií a hub. Fytochromy jsou rozpustné biliproteiny, které u rostlin a zelených řas tvoří dimery. Molekulová hmotnost monomeru se pohybuje kolem 120 kDa. K apoproteinu se jakožto chromofor váže fytochromobilin, což je lineární tetrapyrrol. Chromofor je syntetizován v plastidech, poté migruje do cytoplazmy, kde se váže na apoprotein. Holoprotein tak tvoří apoprotein a fytochromobilin (Sharrock, 2008; Rockwell *et Langarias*, 2010; Huché-Thélier *et al.*, 2016).

Fytochromy existují ve dvou fotoreverzibilních formách. Ve tmě jsou syntetizovány jako inaktivní izomery P_r , které absorbují červené světlo. Do aktivní formy P_{fr} , absorbující dlouhovlnné červené světlo, jsou převedeny díky absorpci červeného světla (okolo 660 nm), ale i absorpcí UV záření, modrého světla či dlouhovlnného červeného světla. Záření o těchto vlnových délkách však vykazuje nižší účinnost. Tento proces se označuje

jako fotokonverze. V důsledku absorpce záření o vlnové délce 730 nm dojde k navrácení aktivního izomeru do původní (inaktivní) formy (viz Obr. 3).



Obr. 3: Fotokonverze fytochromů. Ve tmě syntetizované inaktivní izomery (P_r) přecházejí účinkem červeného světla (R) do aktivní formy (P_{fr}). Aktivní forma účinkem dlouhovlnného červeného světla (FR) přechází zpět do formy inaktivní (převzato z Sharrock, 2008).

Fotokonverze do aktivní formy fytochromu vede k jeho translokaci do jádra, kde se podílí na regulaci exprese určitých genů. (Procházka *et al.*, 1998; Sharrock, 2008; Buchanan *et al.*, 2015; Huché-Thélier *et al.*, 2016). Jednou z možností je potlačení aktivity proteinu COP1 (constitutive photomorphogenesis 1). Jedná se o E3 ubiquitin ligázu, která označuje ubiquitinem několik fotomorfogenezi podporujících transkripčních faktorů pro degradaci. Dalším způsobem je indukce rychlé fosforylace a degradace PIFs (phytochrome-interacting factors), které spadají do skupiny transkripčních faktorů potlačujících fotomorfogenezi. K degradaci fytochromů dochází po označení proteinem COP1 v 26S proteazomu (Li *et al.*, 2011).

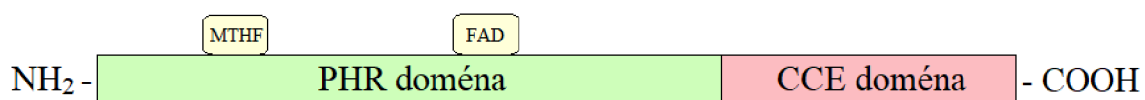
Fytochromy lze rozdělit na fotostabilní a fotolabilní, které na světle rychle degradují. U rostliny *Arabidopsis* lze najít 5 fytochromů: PHYA, PHYB, PHYC, PHYD a PHYE, z nichž pouze PHYA je fotolabilní. Tyto fytochromy se skládají ze stejného chromoforu, avšak liší se typem apoproteinů (Buchanan *et al.*, 2015; Huché-Thélier *et al.*, 2016).

Fytochromy lze také rozdělit dle způsobu aktivity, které vedou k jedné ze tří možných odpovědí. První možností jsou reakce k vysokému ozáření (high-irradiance responses; HIRs). HIRs zodpovídají za deetiolizaci (např. inhibice prodlužování hypokotylu či stimulace rozšiřování kotyledonu). Dalším způsobem jsou reakce k nízkému ozáření (low-fluence responses; LFRs). LFRs se podílejí na změnách iontového toku, pohybu listů, otáčení chlorofylu či genové exprese. Poslední možností jsou reakce k velmi nízkému ozáření (very-low-fluence responses; VLFRs). VLFRs se účastní indukce klíčení nebo exprese genu LHCB (light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein) (Li *et al.*, 2011).

3.3.2 Signální dráhy modrého světla

Kryptochromy

Kryptochromy byly první receptory modrého světla analyzované na molekulární úrovni. Stalo se tak izolací genu *HY4*, který se nachází u *Arabidopsis* a kóduje kryptochrom CRY1 (viz dále) (Ahmad *et al.*, 1993; Bruggemann *et al.*, 1998; Christie *et al.*, 2015). Většina rostlinných kryptochromů jsou proteiny, jejichž hmotnost se pohybuje mezi 70–80 kDa. U těchto proteinů se na N-konci vyskytuje PHR doména (photolyase-related). Tato doména vykazuje značnou homologii s prokaryotní fotolyázou, což je enzym, který se účastní opravy pyrimidinových dimerů v DNA způsobených UV zářením. Nicméně kryptochromy fotolyázovou aktivitu nemají. Na C-konci se nachází CCE doména (cryptochrome C-terminal extension). PHR doména váže dva typy chromoforů (chromofor je molekula absorbující světlo), MTHF (methenyltetrahydrofolát) nebo FAD (flavinadenin dinukleotid) (Cashmore *et al.*, 1999; Lin, 2002; Lin *et al.*, 2003; Taiz *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2017; Amico-Damião *et al.*, 2018). Struktura kryptochromu je znázorněna na Obr. 4.



Obr. 4: Struktura kryptochromu. Na N-konci se nachází PHR doména, která váže chromofory MTHF (methenyltetrahydrofolát) nebo FAD (flavinadenin dinukleotid). Na C-konci se nachází CCE doména (upraveno podle Yang *et al.*, 2017).

Po absorpci modrého světla se elektron z molekuly chromoforu MTHF dostává do excitovaného stavu, čímž v podstatě fotoreceptor aktivuje (proces fotoexcitace). Chromofor MTHF přenáší takto získanou energii na chromofor FAD. FAD se ve tmě nachází v oxidovaném stavu (FAD_{ox}), po ozáření modrým světlem přechází do částečně redukovaného stavu FADH• (flavosemichinon), jedná se o volný radikál. Tyto redoxní změny v chromoforu vedou ke konformační změně PHR domény na N-konci a CCE domény na C-konci. Za tmy se tyto domény nacházejí v inaktivní (uzavřené) formě. Modré světlo způsobí fosforylaci CCE domény, což vede k otevření struktury a odhalení aktivního

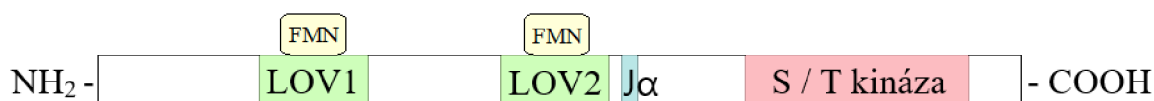
místa. Fosforylace a defosforylace vedou k transdukci signálu a následné reakci (Cashmore *et al.*, 1999; Taiz *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2017).

U *Arabidopsis* byly identifikovány tři kryptochromy: CRY1, CRY2 a CRY3. Kryptochromy CRY1 a CRY2 jsou lokalizovány převážně v jádře, zatímco CRY3 se nachází v chloroplastech a mitochondriích. Vzhledem k tomu, že kryptochromy se nacházejí mimo jiné i u bakterií, existuje hypotéza, že geny *CRY1* a *CRY2* mají původ v endosymbiontickém předkovi současných alfa-proteobakterií a gen *CRY3* v předkovi současných cyanobakterií (Cashmore *et al.*, 1999; Kleine *et al.*, 2003; Amico-Damião *et al.*, 2018). Kryptochromy CRY1 a CRY2 se účastní celé řady regulačních procesů. Jedná se zejména o regulaci fotomorfogeneze, cirkadiálních rytmů, otevírání stomat a vývoji svěřacích buněk, vývoji kořenů, odpovědi vůči virovým či bakteriálním patogenům, odpovědi k abiotickému stresu či regulaci buněčného cyklu. CRY1 hraje hlavní roli v regulaci fotomorfogeneze, zahrnující např. inhibici prodlužování hypokotylu, akumulaci antokyanů, rozvíjení kotyledonu či vývoji chloroplastů. CRY2 se účastní zejména regulace fotoperiodicity související s kvetením (Yu *et al.*, 2010; Amico-Damião *et al.*, 2018). CRY3 se pravděpodobně podílí na opravě UV zářením poškozené jednovláknové DNA (Pokorny *et al.*, 2008).

Fototropiny

Fototropiny jsou receptory o molekulové hmotnosti 120 kDa asociované s plazmatickou membránou. V oblasti C-konce fototropinu se nachází serin / threonin kináza, která podléhá aktivaci světlem. V oblasti N-konce jsou přítomné dvě LOV domény (light, oxygen or voltage; doména regulována světlem, kyslíkem nebo napětím), LOV1 a LOV2. Serin / threonin kinázu a LOV domény kóduje u *Arabidopsis* gen *NPH1* (nonphototropic hypocotyl 1) (Huala *et al.*, 1997; Taiz *et al.*, 2015). LOV domény jsou tvořeny přibližně 110 aminokyselinami a skládají se z pěti antiparalelních β -skládaných listů (A β , B β , G β , H β a I β) a ze čtyř α -helixů (C α , D α , E α a F α). Mezi tyto strukturní elementy se ve tmě jako chromofor nekovalentně váže flavinmononukleotid, FMN. Po ozáření modrým světlem se molekula FMN kovalentně naváže na cysteinový zbytek LOV domén. Tato reakce je vratná při obnovení temnostních podmínek. Předpokládá se, že za tmy je N-konec (tedy oblast s LOV doménami) v inaktivní (uzavřené) konformaci s C-koncem (oblast se serin / threonin kinázou), a tím potlačuje kinázovou aktivitu. (Herrou *et al.*, 2011; Christie *et al.*, 2015; Taiz *et al.*, 2015). Absorpcí modrého světla LOV2 doménou dojde ke konformační změně, včetně změny struktury zvané J α -helix (proteinový region v blízkosti

LOV2 domény). Tyto strukturní změny vedou k odkrytí aktivního místa kinázy a navázání ATP. Tím dojde k autofosforylaci několika serinových zbytků. Aktivace fototropinové kinázy umožňuje transdukcii signálů a následnou odpověď (Pfeifer *et al.*, 2010; Christie *et al.*, 2015; Taiz *et al.*, 2015). Struktura fototropinu je znázorněna na Obr. 5.



Obr. 5: Struktura fototropinu. V oblasti C-konce fototropinu se nachází serin / threonin kináza. V oblasti N-konce jsou přítomné dvě LOV domény, LOV1 a LOV2. Na LOV domény se jako chromofor váže flavinmononukleotid (FMN). V blízkosti LOV2 se nachází struktura J α -helix (upraveno podle Christie, 2007).

U rostliny *Arabidopsis* jsou známy dva fototropiny, fototropin 1 (PHOT1) a fototropin 2 (PHOT2) (Takemiya *et al.*, 2005). PHOT1 se za tmy nachází v oblasti plazmatické membrány, ale po interakci s modrým světlem se přesouvá do cytoplazmy. Fototropin PHOT2 je rovněž za tmy lokalizován u plazmatické membrány, ale v tomto případě modré světlo indukuje jeho asociaci s Golgiho aparátem. Exprese PHOT1 je vysoká v buňkách apikálního háčku (zahnutá horní část stonku klíčících rostlin), v prodlužovací zóně kořene etiolizovaných rostlin a rovněž v epidermálních buňkách listu, mezofylových buňkách či svěracích buňkách (Sakamoto *et Briggs*, 2002; Kong *et al.*, 2006; Kong *et Nagatani*, 2008).

Fototropiny se podílejí na regulaci fototropismu (Christie *et al.*, 1999). Fototropismus je jedním z pohybů rostlin, kdy dochází k ohybu na základě jednostranného působení světla. V případě pozitivního fototropismu dochází k ohybu (např. stonku) směrem ke světlu, u negativního fototropismu dochází k odvracení (např. kořenů) od zdroje světelného záření (Procházka *et al.*, 1998; Sakamoto *et Briggs*, 2002). Tímto způsobem lze v prostředí s nízkým osvětlením optimalizovat zachycení světla listy, a tím zvýšit fotosyntetickou aktivitu rostliny (Fankhauser *et Christie*, 2015).

Fotoreceptory PHOT1 i PHOT2 se také podílejí na regulaci otevírání stomat (průduchů). Průduchy jsou tvořeny svěracími buňkami, mezi nimiž je štěrbin. Velikost štěrbin, která je ovlivněna změnami turgoru svěracích buněk, hraje roli při výměně plynů (CO₂) mezi rostlinou a okolím, a tím dochází i k regulaci transpirace. V reakci na světlo dochází ke

zvýšení koncentrace solí ve svěřacích buňkách, buňky nasávají vodu, mění se jejich tvar a průduchová štěrbinu se otevře. Modré světlo indukuje fosforylaci membránové protonové ATPázy a dochází ke zvýšení gradientu negativního elektrického potenciálu. Tento gradient elektrického potenciálu působí na napětím-řízený K^+ kanál, což vede k akumulaci draselných iontů uvnitř svěřacích buněk, což vede v důsledku k otevření průduchu. Jelikož jsou fototropiny světlem ovládané proteinové kinázy, je pravděpodobné, že jsou zodpovědné za světlem-indukovanou fosforylaci protonové ATPázy (Kinoshita *et al.*, 2001; Lin, 2002; Daszkowska-Golec *et Szarejko*, 2013).

Rostliny dokážou na základě měnících se světelných podmínek měnit vnitrobuněčné rozmístění chloroplastů v listech. Při nízkém ozáření modrým světlem se chloroplasty akumulují na spodní a horní straně stěny buněk listového palisádového parenchymu, což umožňuje maximalizovat fotosyntetické procesy (akumulační reakce). V případě vysoké intenzity záření se naopak chloroplasty přesouvají na boční strany buněčné stěny (paralelně se zářením), minimalizuje se tak poškození fotosyntetického aparátu (vyhýbavá reakce). Hlavní roli ve vyhýbavé reakci hraje PHOT2. Akumulační reakce se účastní oba fototropiny, ačkoliv PHOT2 vykazuje nižší citlivost (Goh, 2009; Taiz *et al.*, 2015).

Skupina fotoreceptorů ZTL / FKF1 / LKP2

Dalším typem fotoreceptorů vnímající UV-A záření a modré světlo jsou receptory patřící do skupiny Zeitlupe (ZTL) / flavin-binding kelch repeat F box protein (FKF1) / LOV kelch protein 2 (LKP2) (Suetsugu *et Wada*, 2012). Stejně jako fototropiny tyto receptory vážou flavinmononukleotid (FMN) jakožto chromofor. Skládají se ze tří domén: LOV domény, F-boxu na N-konci a proteinového motivu kelch na C-konci. LOV doména nekovalentně váže chromofor FMN. F-box interaguje s ubikvitinačním komplexem E2-E3, což vede k proteinové degradaci. Motiv kelch se skládá z šesti tandemových repetitivních utvářející β -helix. Ozáření modrým světlem vede ke konformační změně, čímž dojde k autofosforylaci fotoreceptoru, a tím k indukci signalizace (Christie *et al.*, 1999; Imaizumi *et al.*, 2003; Huché-Thélier *et al.*, 2016). Tato skupina fotoreceptorů hraje hlavní roli v regulaci cirkadiálního rytmu, tedy asi 24hodinové periody, kdy rostliny musí reagovat na pravidelně se měnící světelné a teplotní podmínky (Schultz, 2005).

3.3.3 Fotoreceptory a klíčení

Světlo je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňuje klíčení. To je zejména důležité při pokrytí semen půdou. Semena lze rozdělit podle toho, jaká je rychlost jejich klíčení v závislosti na světelných podmínkách. Pokud má světlo pozitivní vliv na klíčení rostlin, označujeme takové druhy jako kladně fotoblastické. Pokud naopak světlo klíčení inhibuje, označuje tyto rostliny jako záporně fotoblastické (Procházka *et al.*, 1998).

Z fotoreceptorů se na regulaci klíčení podílejí převážně fytochromy, tedy receptory pro červené světlo. U *Arabidopsis* je červené světlo nezbytné pro aktivaci fytochromů, a tím i pro zahájení klíčení. Fytochromy podporují syntézu giberelinů a také snižují inhibiční účinky kyseliny abscisové. Z fytochromů hrají hlavní roli PHYA a PHYB. Exprese PHYA v suchých semenech je velmi nízká, zatímco PHYB se exprimují hojně. Z toho vyplývá, že PHYB je nejdůležitější z fotoreceptorů, které se podílejí na iniciaci klíčení (Paik *et Huq*, 2019). S fytochromy interagují transkripční faktory PIFs. Tyto faktory potlačují reakce rostlin ke světlu. U *Arabidopsis* hrají roli zejména faktory PIF1 a PIF8. Tyto faktory fungují jako represory klíčení v temnu, přičemž PIF1 tak působí díky inhibici signální dráhy giberelinů. Jak již bylo řečeno dříve, fytochromy se po ozáření translokují do jádra. Tam probíhá degradace faktorů PIF1 a PIF8, tím se zmírní jejich represivní účinky a semeno může klíčit (Leviar *et Quail*, 2011; Pham *et al.*, 2018; Legris *et al.*, 2019; Kathare *et Huq*, 2021; Oh *et al.*, 2020).

3.3.4 Fotoreceptory a abiotický stres

Vzhledem k rozsáhlým regulačním mechanismům, které souvisejí s funkcí fotoreceptorů, je zřejmé, že právě světelné signály budou hrát roli v reakci rostlin na abiotický stres. Následující kapitoly budou věnovány kryptochromům (CRYs; fotoreceptory pro modré světlo) a fytochromům (PHYs; fotoreceptory pro červené světlo).

Sucho

Sucho je jedním z hlavních abiotických stresových faktorů (Procházka *et al.*, 1998). Již dřívější studie prokázaly, že kryptochromy hrají roli v reakci rostlin *Arabidopsis* vůči suchu, a to prostřednictvím regulace otevírání stomat. Po více než týdnu bez zavlažování vykazovali dvojité mutanti *cry1cry2* vyšší odolnost vůči suchu než wild-type (WT). Nicméně transgenní rostliny *CRY1-ovx*, které nadměrně exprimují CRY1, vykazovaly vyšší ztráty vody. Dělo se tak v důsledku zvýšeného otevírání průduchů. Na tento jev měla

pravděpodobně vliv interakce kryptochromů s proteinem COP1 (constitutive photomorphogenesis 1), který otevírání průduchů potlačuje (Mao *et al.*, 2005). Přesný mechanismus regulace ztráty vody kryptochromy není znám, na regulaci se podílejí další faktory včetně hormonů (převážně kyselina abscisová) (Saradadevi *et al.*, 2017; D'Amico-Damião *et Carvalho*, 2018).

Roli v toleranci sucha hrají také fytochromy PHYB (Junior *et al.*, 2021). Ukázalo se, že u mutantů *PHYB Arabidopsis* došlo ke změně kontroly transpirace. U těchto mutantů byla za stresu suchem pozorována snížená vodivost v průduchách v porovnání s WT, což mohlo souviset s indukcí syntézy kyseliny abscisové. Nicméně bylo také zjištěno, že u mutantů *PHYB* došlo ke snížení hustoty průduchů, což vedlo ke snížení transpirace, a tím i snížení příjmu CO₂. Nízká hladina CO₂ v rostlinách může vést k syntéze škodlivých reaktivních forem kyslíku (ROS) (Boccalandro *et al.*, 2009; Boggs *et al.*, 2010; González *et al.*, 2012; Junior *et al.*, 2021).

Intenzivní záření

Kryptochromy se rovněž podílejí na ochraně rostlin před příliš intenzivním zářením. Děje se tak například díky akumulaci antokyanu. Bylo zjištěno, že se mutantní alely v oblasti CCE domény *CRY1* podílejí na regulaci hladiny antokyanů (El-Esawi *et al.*, 2017). Navíc se zvýšenou expresí genu *CRY1a* v rajčeti (*Solanum lycopersicum* L.) rostla akumulace antokyanu v listech. Tato studie ukázala, že akumulace antokyanu souvisela s rozdílem přítomného množství mRNA a proteinu transkripčního faktoru HY5 (long hypocotyl 5), který interferuje s promotory genů pro biosyntézu antokyanu (Liu *et al.*, 2018). Podobných výsledků dosáhla studie s *CRY2* (Giliberto *et al.*, 2005). Další studie poukázaly na roli *CRY* v ostatních reakcích na intenzivní záření jako je např. regulace redoxní rovnováhy elektronového transportu při fotosyntéze (D'Amico-Damião *et Carvalho*, 2018).

I fytochromy se pravděpodobně účastní zmírňování účinků stresu způsobeného přílišnou intenzitou ozáření. Při studiu mutantů *PIF1* u *Arabidopsis* bylo zjištěno, že tyto mutanti vykazují zvýšenou akumulaci chlorofylu, zatímco u mutantů *PHYB* byl zaznamenán její pokles. *PIF1* tedy negativně reguluje biosyntézu chlorofylu. Navíc *PIF4* a *PIF5* negativně regulují syntézu dalšího pigmentu, antokyanu. Tím se předchází tvorbě ROS (Huq *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015; Junior *et al.*, 2021).

Teplota

Jak již bylo řečeno, na zvládání stresu způsobeného vysokou teplotou se podílí HSP proteiny (Lamers *et al.*, 2020). Exprese těchto proteinů je silně regulovaná kryptochromy, z čehož vyplývá, že se tyto fotoreceptory podílejí na reakcích spojených s vysokou teplotou (Yang *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že CRY1 pro zvýšení tolerance vůči horku potlačuje biosyntézu auxinu, což vede k morfologickým změnám rostlin *Arabidopsis* (D'Amico-Damião *et Carvalho*, 2018). Navíc CRY při zvýšené teplotě interaguje s některými promotory závislých na PIF4, který je důležitou součástí transdukce signálu z modrého světla (Ma *et al.*, 2016). Na reakci *Arabidopsis* vůči chladu se podílí HY5, COP1 a Z-box. Z-box je regulační *cis*-element, lokalizovaný v promotoru odpovídajících genů, jako je např. HY5 transkripční faktor (Catalá *et al.*, 2011; D'Amico-Damião *et Carvalho*, 2018).

Již na základě skutečnosti, že fytochromy mohou přerušit dormanci semen, která byla vyvolána chladem, lze očekávat, že budou hrát roli v reakci rostlin na zvýšenou či naopak sníženou teplotu (Donohue *et al.*, 2008). PHYB se podílí na vnímání teploty prostřednictvím na teple závislé fotokonverze z aktivní formy P_{fr} do inaktivní P_r (Legris *et al.*, 2016). Například zvýšenou toleranci k chladu vykazovaly *PHYB* mutanti rýže (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare). Důkazem byl snížený únik elektrolytu a nižší koncentrace malondialdehydu (MDA; produkt peroxidace lipidů) než tomu bylo u WT, což naznačuje, že integrita membrán mutantů byla vyšší a zároveň lipidová peroxidace probíhala v menší míře (He *et al.*, 2016). Na druhou stranu jiné studie u *Arabidopsis* zaznamenaly přesně opačný jev (Jiang, 2020). Tolerance k chladu regulovaná PHYB je zřejmě v interakci s geny *COR* (cold-related genes). U *Arabidopsis* došlo k expresi *COR* genů aktivované transkripčními faktory CBFs (C-repeat binding factors) a DREB1s (drought response element binding factor 1), které byly při vystavení chladu indukovány PHYB (Kim *et al.*, 2002; Junior *et al.*, 2021). Reakce rostlin k chladu regulované PHYB však nejspíše zahrnují další molekulární mechanismy, včetně zapojení fytohormonů jako např. kyseliny abscisové či jasmonové (Wang *et al.*, 2016). Nicméně fytochromy jsou zapojeny i v regulaci při stresu způsobeném vysokou teplotou. U *PHYB* mutanta bylo po vystavení vysoké teplotě zaznamenáno větší prodloužení stonků než u WT, rovněž tento mutant vykazoval nižší přítomnost MDA. (Gavassi *et al.*, 2017). Roli v prodloužování hypokotylu *Arabidopsis* při zvýšené teplotě hrají také PIFs, zejména PIF4 (Koini *et al.*, 2009). Dalším důkazem pro roli PHYB při vysoké teplotě byla studia, při které bylo zjištěno, že *PHYB*

mutant *Arabidopsis* prokazoval vyšší životnost a delší postranní kořeny než WT (Song *et al.*, 2017). Na rozdíl od rostlin vystavených chladu vykazovaly rostliny vystavené vyšším teplotám pokles nenasycených mastných kyselin, které jsou schopny zmírnit důsledky oxidativního poškození a zvýšit toleranci k vyšším teplotám (Arico *et al.*, 2019; Junior *et al.*, 2021).

Zasolení

Krytochromy hrají roli v reakci rostlin na zasolení. Bylo pozorováno, že transgenní linie *Arabidopsis*, která nadměrně exprimuje *TaCRY1a* a *TaCRY2* (původem z *Triticum aestivum*), je daleko citlivější k zasolení (NaCl o koncentraci $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) než WT. Zasolení mělo negativní vliv i na klíčení WT, nicméně u transgenní linie byl tento efekt horší (Xu *et al.*, 2009). Dalším výzkumem bylo zjištěno, že u transgenní linie *Arabidopsis*, která při zasolení nadměrně exprimuje *SbCRY1a* gen (původem ze *Sorghum bicolor*), došlo k modifikaci několika genů odpovídajících na stresové podmínky. Avšak mutant *CRY1 Arabidopsis* vykazoval při zasolení a přítomnosti ABA lepší klíčivost a životnost než WT, což naznačuje jeho vyšší toleranci k zasolení. Na regulaci těchto mechanismů se pravděpodobně podílí HY5-ABI5 regulon (long hypocotyl 5-ABA insensitive 5), který spouští expresi transkriptů odpovídajících na stres a ABA. CRY1 se tedy podílí na regulaci stresu zasolením při zapojení ABA signálních drah (Xu *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2018; D'Amico-Damião *et al.*, 2018).

Při zasolení dochází u rostlin k produkci ROS. Rostliny se škodlivým účinkům ROS brání syntézou tzv. ROS scavengers, které s ROS interagují (Akyol *et al.*, 2020). Podobné antioxidační vlastnosti vykazují i další sloučeniny vzniklé konverzí hemu katalyzovanou hemoxidázou (HO). Jelikož *PCDI* (phytochrome chromophore-deficient) mutant u *Pisum sativum* vykazoval sníženou aktivitu HO, předpokládá se, že HO je regulována fytochromy. Z těchto výsledků vychází další předpoklad, že fytochromy regulují ROS scavengers prostřednictvím aktivity HO (Weller *et al.*, 1996; Mahawar *et al.*, 2017; Junior *et al.*, 2021). Navíc byla u *Arabidopsis* pozorována vzájemná regulace mezi fytochromy a HO, kdy *HY1* mutant (HO deficience) vykazoval úplnou necitlivost k červenému či dlouhovlnnému červenému světlu (Terry *et al.*, 2002). Signalizace regulovaná fytochromy může rovněž ovlivňovat transkripci proteinů, které jsou známy pro svou roli v toleranci rostlin vůči zasolení (Junior *et al.*, 2021). Například STO protein (salt tolerance-related protein) podporuje u transgenních linií *Arabidopsis*, které při zasolení tento protein nadměrně exprimují, růst kořenů (Nagaoka *et al.*, 2003). Rovněž bylo

zjištěno, že PHYB potlačují SPA1-COP1-PIF1 komplex, což umožní transkripci STO proteinu, který poté indukuje růst kořenů při zasolení (Junior *et al.*, 2021).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro experimenty byla použita semena následujících genotypů *Arabidopsis thaliana*:

- kontrolní genotyp *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotyp Landsberg *erecta* (*Ler*)
- kontrolní genotyp *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotyp Columbia (*Col*)
- recesivní mutant *cry1-1* odvozený od ekotypu Landsberg *erecta* (*Ler*): mutace v jednom genu (single gene mutant); mutace indukovaná pomocí urychlených neutronů; CS70 (Ahmad *et* Cashmore, 1993)
- recesivní mutant *cry2-1* odvozený od ekotypu Columbia (*Col*): mutace v jednom genu (single gene mutant); mutace indukovaná pomocí urychlených neutronů; N3732 (Koorneef *et al.*, 1980; Lin *et al.*, 1996).

Semena mutantů *cry* byla objednána prostřednictvím TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>) a laskavě poskytnuta ABRC (*Arabidopsis* Biological Research Center, Ohio State University, USA; <https://abrc.osu.edu/>).

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie a roztoky

- 70% a 96% ethanol
- Deionizovaná voda sterilní
- Fytoagar (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Cat. No. P1003.1000)
- Manitol
- MES pufr
- Murashige *et* Skoog médium (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Cat. No. M0221.0050)
- Roztok hydroxidu draselného (KOH) o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
- Roztok Savo (NaClO; 1,4 % aktivního chloru)

- Sacharóza

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytické váhy
- Autokláv
- Chladnička
- Kultivační komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) s modrým světlem (zdroj modrého světla: zářivka Philips TLD-36W/18-Blue s maximální intenzitou osvětlení $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při vlnové délce 440 nm)
- Kultivační komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) s červeným světlem (zdroj červeného světla: zářivka Philips TLD36W/15-Red s maximální intenzitou osvětlení při $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při vlnové délce 660 nm)
- Laminární box (Camfil MD14-2G101, Camfil s.r.o., ČR)
- Magnetická míchačka
- pH metr
- Předvážky

4.4 Použité experimentální postupy

Příprava média

Pro experiment bylo použito kultivační médium MS (Murashige *et* Skoog, 1962) bez nebo s přídavkem manitolu. Pro médium s obsahem manitolu byly vybrány koncentrace $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $300 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $350 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. 1 l základního média bez manitolu byl připraven následujícím způsobem: Do 1l Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 0,5 l destilované vody, vloženo míchátko a baňka byla umístěna na magnetickou míchačku. Za stálého míchání bylo postupně přidáno 10 g sacharózy, 4,3 g MS média a 195,2 mg pufru MES. Po rozpuštění všech látek byl objem doplněn destilovanou vodou na 1 l. Pomocí roztoku hydroxidu draselného (KOH) o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo upraveno pH média na 6,1 – do média byl roztok KOH přidáván po kapkách pomocí plastové Pasteurovy pipety, pH bylo měřeno pomocí pH metru. Do třech 0,5l termolahví se šroubovacím uzávěrem

bylo přidáno 2,8 g agaru (pro 400 ml média) nebo 1,4 g agaru (pro 200 ml média) – navážka agaru byla vypočítána tak, aby výsledná koncentrace agaru byla vždy 0,7 %. K agaru bylo přilito médium o objemu 400 ml, 400 ml a 200 ml a roztok byl promíchán. Lahve byly řádně popsány. Uzávěr lahve byl obalen alobalem a opatřen páskou pro indikaci sterilizace. Médium v lahvích bylo sterilizováno v parním autoklávu a poté uchováváno v lednici. Obdobně bylo připraveno médium s přídatkem manitolu o daných koncentracích. Byla spočítána navážka manitolu (molární hmotnost manitolu činí $182,172 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$): pro přípravu 1 l média o koncentraci $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ činila navážka 36,44 g manitolu, pro koncentraci $300 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 54,66 g manitolu a pro koncentraci $350 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 63,77 g manitolu. Manitol byl přidáván do média po přidavku pufru MES. Dále bylo médium zpracováváno stejně jako základní bez manitolu.

Stratifikace, sterilizace a výsev semen pro studium klíčivosti

Od mutantního a kontrolního genotypu *Arabidopsis thaliana* bylo do 1,5 ml plastových mikrozkupek typu Eppendorf naváženo vždy 8 mg daných semen (8 mg odpovídá přibližně 400 semenům). K semenům byl přidán cca 1 ml deionizované vody. Řádně popsané mikrozkupek byly vloženy na 3 dny do chladničky bez přístupu světla (stratifikace).

Semena byla povrchově sterilizována přidáním zředěného komerčního roztoku Savo (ředění 0,3 l Savo + 0,7 l H_2O ; 1,4 % aktivního chloru). Sterilizace probíhala 25 až 30 minut za častého protřepávání mikrozkupek. Po uplynutí doby sterilizace byl v laminárním boxu automatickou mikropipetou (rozsah 100–1000 μl) a sterilní plastové špičky roztok Sava odsát. Poté byla semena celkem šestkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Po posledním propláchnutí byla voda ponechána v mikrozkupe se semeny.

Sterilní kultivační média o příslušné koncentraci manitolu (0, 200, 300 a $350 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) byla rozehrána v mikrovlnné troubě. V laminárním boxu bylo připraveno 24 sterilních Petriho misek. Pomocí sterilní 50 ml plastové zkupek bylo do každé misky nalito 20 ml kultivačního média – pro médium o dané koncentraci manitolu bylo připraveno celkem šest misek. Po ztuhnutí média byla vyseta semena – tři misky s médiem o stejné koncentraci manitolu pro každý genotyp. Výsev byl proveden pomocí automatické mikropipety s rozsahem 2–20 μl . Plastová špička byla skalpelem (sterilizovaném v 96% ethanolu a ožehnutém nad plamenem lihového kahanu) seříznuta do odpovídajícího

průměru. Semena byla pravidelně vysévána na médium v množství přibližně 30 semen na misku. Po výsevu byly misky dvakrát oblepeny páskou z netkané textilie (Softpore, ČR) a řádně popsány (datum výsevu, genotyp, koncentrace manitolu v médiu a světelné podmínky kultivace).

Misky byly vertikálně umístěny do kultivační komory s modrým a červeným světlem. Misky určené pro kultivaci za tmy byly obaleny alobalem a umístěny do spodní části kultivační komory. Semena byla inkubována při teplotě 23 °C po dobu 7 dní.

Stratifikace, sterilizace a výsev semen pro studium růstových reakcí

Od mutantního a kontrolního genotypu *Arabidopsis thaliana* bylo do 1,5 ml plastových mikrozkušavek typu Eppendorf naváženo vždy 5 mg daných semen (5 mg odpovídá přibližně 250 semenům). Semena byla stratifikována způsobem popsaným výše.

Semena byla povrchově sterilována způsobem popsaným výše.

Vysterilizované základní kultivační médium bylo rozeřáno v mikrovlnné troubě. V laminárním boxu bylo připraveno 10 sterilních Petriho misek. Pomocí sterilní 50ml plastové zkumavky bylo do každé misky nalito 20 ml základního kultivačního média bez manitolu. Po ztuhnutí média byla semena pravidelně vysévána na médium v množství přibližně 50 semen na misku, přičemž se pro kontrolní i mutantní genotyp jednalo vždy o 5 misek. Po výsevu byly misky dvakrát oblepeny páskou z netkané textilie a řádně popsány (datum výsevu, genotyp, koncentrace manitolu v médiu a světelné podmínky kultivace). Misky byly zabaleny alobalem a vertikálně umístěny do spodní části kultivační komory s modrým světlem. Semena byla inkubována při teplotě 23 °C po dobu 2–4 dní.

Pro přenos vyklíčených semen byly připraveny Petriho misky s kultivačním médiem o příslušné koncentraci manitolu stejným způsobem popsaným výše. Misky s vyklíčenými semeny byly v laminárním boxu otevřeny pomocí sterilního skalpelu. Samotný přenos vyklíčených semen na připravené misky se ztuhlým médiem byl proveden pomocí pinzety, která byla sterilizována v 96% ethanolu a ožehnutá nad plamenem lihového kahanu. Na každou misku bylo přeneseno 3–15 vyklíčených semen tak, aby v každé misce byla rovnoměrně zastoupena semena různého stupně vyklíčení. Po přenosu vyklíčených semen byly misky dvakrát oblepeny páskou z netkané textilie a řádně popsány (datum přenosu, genotyp, koncentrace manitolu v médiu a světelné podmínky kultivace).

Misky s rostlinami byly umístěny do kultivačních komor s modrým a červeným světlem. Misky se semeny určenými pro kultivaci ve tmě byly obaleny alobalem a umístěny do spodní části kultivační komory. Rostliny byly inkubovány při teplotě 23 °C po dobu 7 dní.

4.5 Použité vyhodnocovací postupy a zpracování výsledků

4.5.1 Studium klíčivosti semen

Od třetího dne po výsevu byl každý den zaznamenáván počet vyklíčených semen z celkového počtu zasetých semen pro každý genotyp, světelné podmínky, koncentraci manitolu a spočítána procentuální klíčivost. Klíčivost byla zaznamenávána denně až do sedmého dne výsevu včetně. Experiment byl pro získání co nejpřesnějších výsledků prováděn vždy ve třech opakováních, proto byla výsledná hodnota procenta vyklíčených semen vždy průměrem všech nezávislých opakování. Z těchto výsledků byla poté pomocí Microsoft Excel stanovena směrodatná odchylka (funkce SMODCH.VÝBĚR.), střední chyba průměru a procento inhibice.

Vzorec pro výpočet procenta inhibice klíčivosti:

$$\% \text{ inhibice} = \frac{a - b}{a} \times 100 \%$$

a ... průměrné procento klíčivosti při koncentraci manitolu 0 mmol·l⁻¹

b ... průměrné procento klíčivosti při koncentraci manitolu 200, 300 nebo 350 mmol·l⁻¹

Na základě těchto výsledků byly poté zpracovány grafy.

4.5.2 Studium růstových reakcí

Sedmý den kultivace vyklíčených semen obou genotypů v daných podmínkách (světelné podmínky a koncentrace manitolu) bylo provedeno měření délky kořene a hypokotylu každé rostliny. Měření bylo provedeno na tmavém podkladu pomocí pravítka s přesností 1 mm. Výsledky byly zaznamenány do tabulek. Byl vypočítán průměr naměřených délek kořene a hypokotylu pro každý genotyp v závislosti na daných podmínkách. Experiment byl pro získání co nejpřesnějších výsledků prováděn vždy ve třech opakováních, proto byla

výsledná hodnota délek kořenů či hypokotylů vždy průměrem všech opakování. Z těchto výsledků byla poté pomocí Microsoft Excel stanovena směrodatná odchylka (funkce SMODCH.VÝBĚR.), střední chyba průměru a procento inhibice.

Vzorec pro výpočet procenta inhibice růstu kořene a hypokotylu:

$$\% \text{ inhibice} = \frac{c - d}{c} \times 100 \%$$

c ... průměrná délka kořene či hypokotylu při koncentraci manitolu $0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

d ... průměrná délka kořene či hypokotylu při koncentraci manitolu 200, 300 nebo $350 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

Na základě těchto výsledků byly poté zpracovány grafy.

5 VÝSLEDKY

Pro stanovení role receptorů modrého světla v citlivosti rostlin *Arabidopsis* k osmotickému stresu byly použity mutantní rostliny *cry1-1* a *cry2-1*. Jako kontrolní genotyp pro mutantu *cry1-1* byl použit ekotyp Landsberg *erecta* (*Ler*) rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh a jako kontrolní genotyp pro mutantu *cry2-1* ekotyp Columbia (*Col*) rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Osmotický stres byl indukován přidáním manitolu do kultivačního média, a to v koncentracích 0, 200, 300 a 350 mmol·l⁻¹.

Experimenty pro všechny genotypy zahrnovaly studium citlivosti klíčivosti semen k manitolu v závislosti na světelných podmínkách (tma – D, modré světlo – BL a červené světlo – RL) a studium růstových reakcí k manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL a RL).

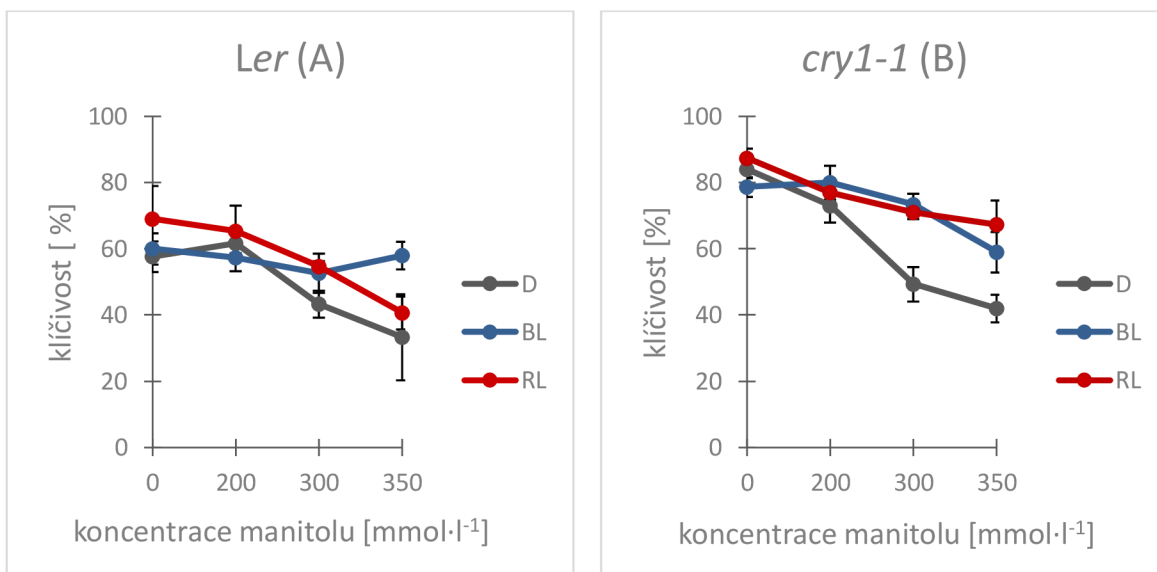
Studium růstových reakcí zahrnovalo jak analýzu prodlužování hypokotylu, tak analýzu prodlužování kořene. Tyto analýzy probíhaly souběžně v rámci jednoho experimentu.

5.1 Studium klíčivosti semen

5.1.1 Mutant *cry1-1*

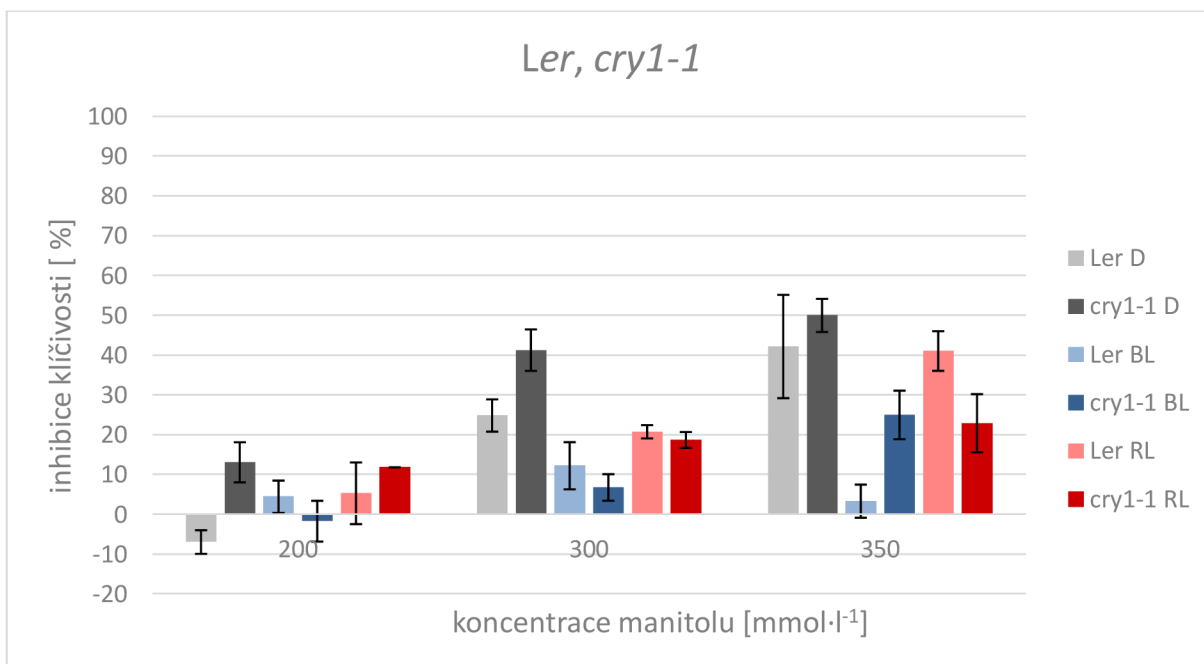
Z grafů (Obr. 6), který zobrazuje klíčivost kontrolního genotypu *Ler* v závislosti na koncentraci manitolu a světelných podmínkách, lze vyčíst, že při nulové koncentraci manitolu dosahovala klíčivost semen po 7 dnech inkubace 57,7 % ve tmě (D), 60,0 % na modrém světle (BL) a 69,0 % na červeném světle (RL). U mutantu *cry1-1* lze rovněž při nulové koncentraci manitolu pozorovat nejvyšší klíčivost na RL (87,3 %), ve tmě byla klíčivost nižší (84,0 %) a na BL byla nejnižší (78,7 %).

Obecně lze říci, že za všech světelných podmínek a při všech testovaných koncentracích manitolu dosahovala semena mutantu *cry1-1* vyšší klíčivosti než u kontrolního genotypu *Ler*. Výjimkou byla klíčivost na BL při koncentraci manitolu 350 mmol·l⁻¹, kdy byly její hodnoty u obou genotypů srovnatelné: klíčivost *Ler* dosahovala 58,0 % a klíčivost *cry1-1* 59,0 %.



Obr. 6: Grafy závislosti klíčivosti semen rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Landsberg erecta* (Ler; A) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafech jsou vyneseny hodnoty průměrného klíčení semen v procentech získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace semen.

Z grafu (Obr. 7) je patrné, že světelné podmínky silně ovlivňovaly toleranci obou genotypů k zasolení. Zatímco u semen genotypu *Ler* kultivovaných na BL a RL docházelo při koncentraci manitolu 200 mmol·l⁻¹ k přibližně 5% inhibici klíčivosti (BL 4,4 %; RL 5,3 %), u semen kultivovaných ve tmě nastala mírná stimulace klíčivosti v porovnání se semeny kultivovanými při nulové koncentraci manitolu. Rozdíly v klíčivosti při koncentraci manitolu 200 mmol·l⁻¹ lze pozorovat i u mutantu *cry1-1*, kdy při kultivaci na RL a D nastala 11,8% (RL) a 13,1% (D) inhibice, ale při kultivaci na BL docházelo u semen k velmi mírné stimulaci klíčivosti v porovnání s kultivací při nulové koncentraci manitolu.



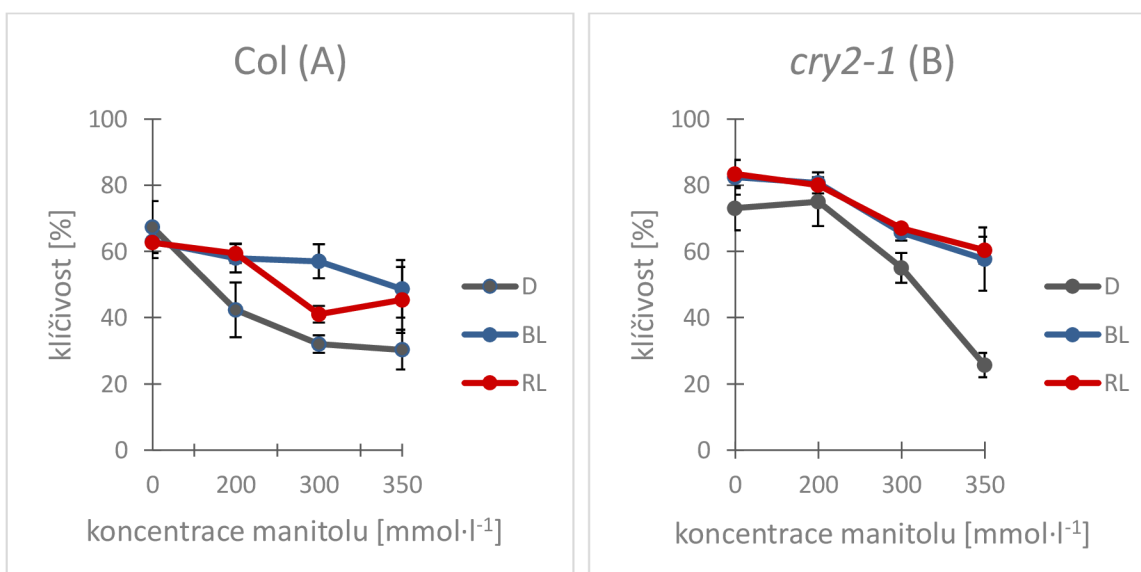
Obr. 7: Graf závislosti inhibice klíčivosti semen rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Landsberg erecta* (*Ler*) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrné procentuální inhibice klíčivosti semen získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace semen.

Při kultivaci na médiu s koncentrací manitolu 300 mmol·l⁻¹ docházelo u semen genotypu *Ler* k nejsilnější inhibici klíčivosti ve tmě (24,9 %). Naopak BL snižovalo citlivost semen k zasolení, inhibice dosahovala pouze 12,2 %. U mutantu *cry1-1* lze pozorovat ještě větší rozdíly související se světelnými podmínkami při stejné koncentraci manitolu. Nejsilnější inhibice klíčivosti semen nastala rovněž při kultivaci ve tmě (41,3 %), nicméně BL výrazně snížilo citlivost semen k zasolení tak, že inhibice dosahovala jen 6,8 %. U semen kultivovaných na RL došlo k podobné míře inhibice klíčivosti u obou genotypů, a to 20,8 % (*Ler*) a 18,7 % (*cry1-1*).

U semen genotypu *Ler* kultivovaných na médiu s koncentrací manitolu 350 mmol·l⁻¹ byla inhibice klíčivosti při RL i ve tmě téměř shodná, přibližně 40 % (RL 41,1 %; D 42,2 %). Při této koncentraci manitolu BL silně snížilo citlivost semen k zasolení, inhibice klíčivosti byla v tomto případě pouze 3,3 %. V případě kultivace semen mutantu *cry1-1* na médiu s koncentrací manitolu 350 mmol·l⁻¹ nastala nejvyšší inhibice klíčivosti semen ve tmě (50,0 %). Inhibice klíčivosti semen na BL a RL se v obou případech pohybovala kolem 25 % (BL 25,0 %; RL 22,9 %).

5.1.2 Mutant *cry2-1*

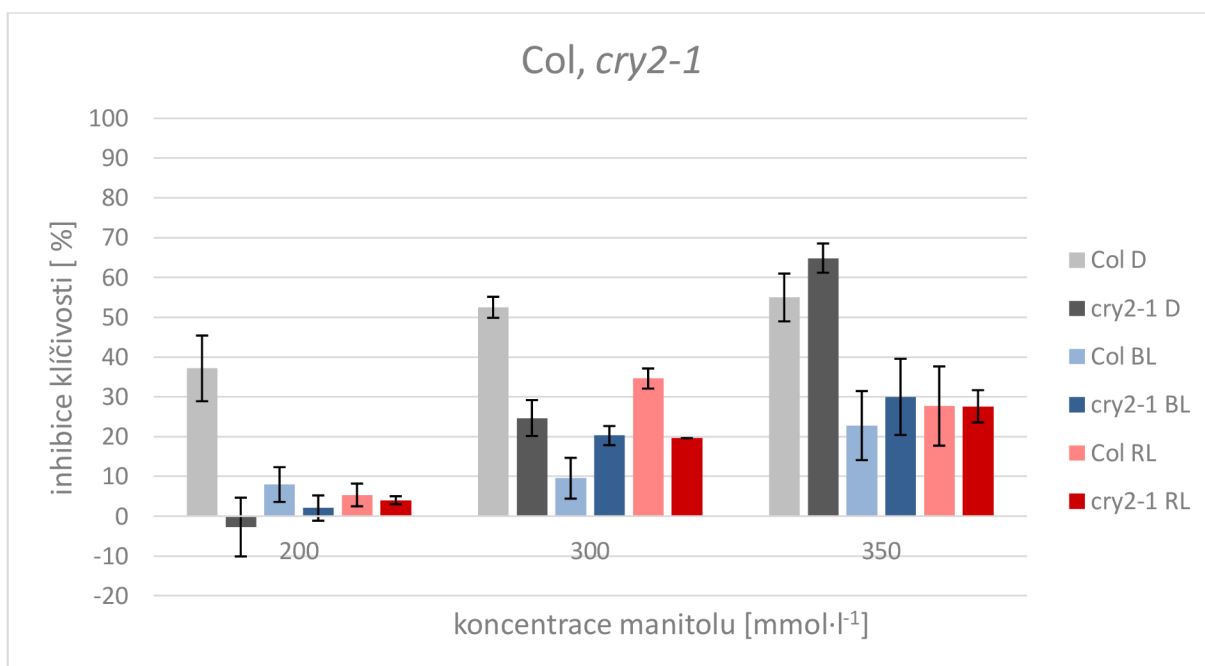
Na Obr. 8 je patrné, že světelné podmínky neovlivnily klíčivost semen genotypu Col při nulové koncentraci manitolu, ve všech případech se klíčivost pohybovala okolo 65 % (D 67,3 %; BL 63,0 %; RL 62,7 %). Naopak u mutanta *cry2-1* dosahovala klíčivost při kultivaci bez přítomnosti manitolu na BL 82,3 % a na RL 83,3 %, ale ve tmě byla asi o 10 % nižší (73,0 %). U genotypu Col byla klíčivost semen při koncentraci manitolu 300 mmol·l⁻¹ kultivovaných na RL o 16 % nižší než u semen kultivovaných na BL (RL 41,0 %; BL 57,0 %). Při koncentraci manitolu 350 mmol·l⁻¹ se rozdíl v klíčivosti semen kultivovaných na RL a BL snížil na 3,4 % (RL 45,3 %; BL 48,7 %). Klíčivost semen kontrolního genotypu Col kultivovaných ve tmě byla u všech testovaných koncentrací manitolu (200, 300, 350 mmol·l⁻¹) značně nižší než u BL a RL. Se zvyšující se koncentrací manitolu se klíčivost semen *cry2-1* kultivovaných na BL a RL téměř shodně snižovala až na přibližně 60 % při 350 mmol·l⁻¹ (BL 57,7 %; RL 60,3 %). Klíčivost semen mutanta se ve tmě začala prudce snižovat ze 75,0 % při koncentraci manitolu 200 mmol·l⁻¹ až na 25,7 % při koncentraci manitolu 350 mmol·l⁻¹.



Obr. 8: Grafy závislosti klíčivosti semen rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col; A) a od něj odvozeného mutanta *cry2-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafích jsou vyneseny hodnoty průměrné klíčivosti semen v procentech získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace semen.

Z grafu na Obr. 9 je patrné, že při koncentraci manitolu 200 mmol·l⁻¹ došlo k silné inhibici klíčivosti pouze u semen genotypu Col kultivovaných ve tmě (inhibice 37,1 %). Při stejné koncentraci manitolu byla v ostatních případech u obou genotypů za všech světelných

podmínek inhibice klíčivosti maximálně do 8 %. S rostoucí koncentrací manitolu míra inhibice klíčivosti u obou genotypů vzrůstala. Vliv světelných podmínek na citlivost k zasolení se při koncentraci manitolu $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ve všech případech lišil, a to i mezi oběma genotypy Col a *cry2-1*. Při této koncentraci byla nejvyšší míra inhibice zaznamenána stále u semen Col kultivovaných ve tmě (52,5 %), následována mírou inhibice klíčivosti rovněž u semen Col, kultivovaných na RL (34,6 %). V případě semen kultivovaných ve tmě dosahovala míra inhibice klíčivosti u *cry2-1* pouhých 24,7 %. Na BL vykazoval vyšší citlivost k zasolení mutant *cry2-1* (inhibice 20,2 %), u semen Col byla míra inhibice nižší (9,5 %). Naopak na RL vykazovala vyšší citlivost k zasolení semena Col (inhibice 34,6 %), u semen *cry2-1* inhibice dosahovala 19,6 %. Při koncentraci manitolu $350 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ se míra inhibice při srovnání obou genotypů více vyrovnala. Inhibice klíčivosti semen *cry2-1* kultivovaných ve tmě dosahovala 64,8 %, kdežto u semen Col to bylo 55,0 %. V případě semen kultivovaných na BL byla inhibice semen *cry2-1* a Col podobná, a to 22,8 a 30,0 %. Semena obou genotypů kultivovaných na RL vykazovala podobnou míru inhibice klíčivosti, a to necelých 28 %.



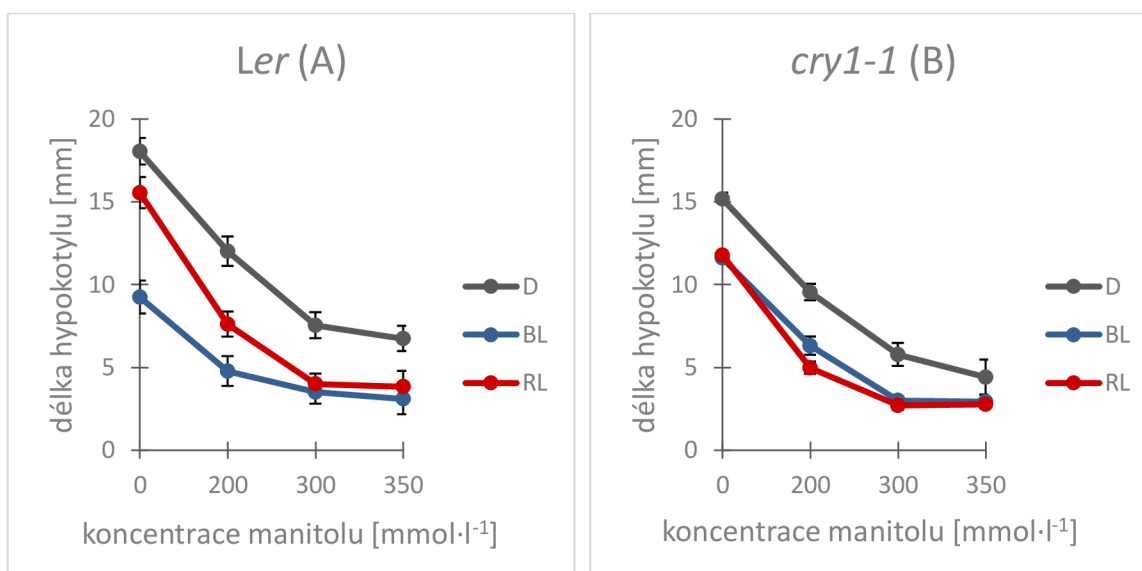
Obr. 9: Graf závislosti inhibice klíčivosti semen rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrné procentuální inhibice klíčivosti semen získané ze tří nezávislých experimentů \pm SE po 7 dnech kultivace semen.

5.2 Studium růstových reakcí

5.2.1 Elongace hypokotyly

5.2.1.1 Mutant *cry1-1*

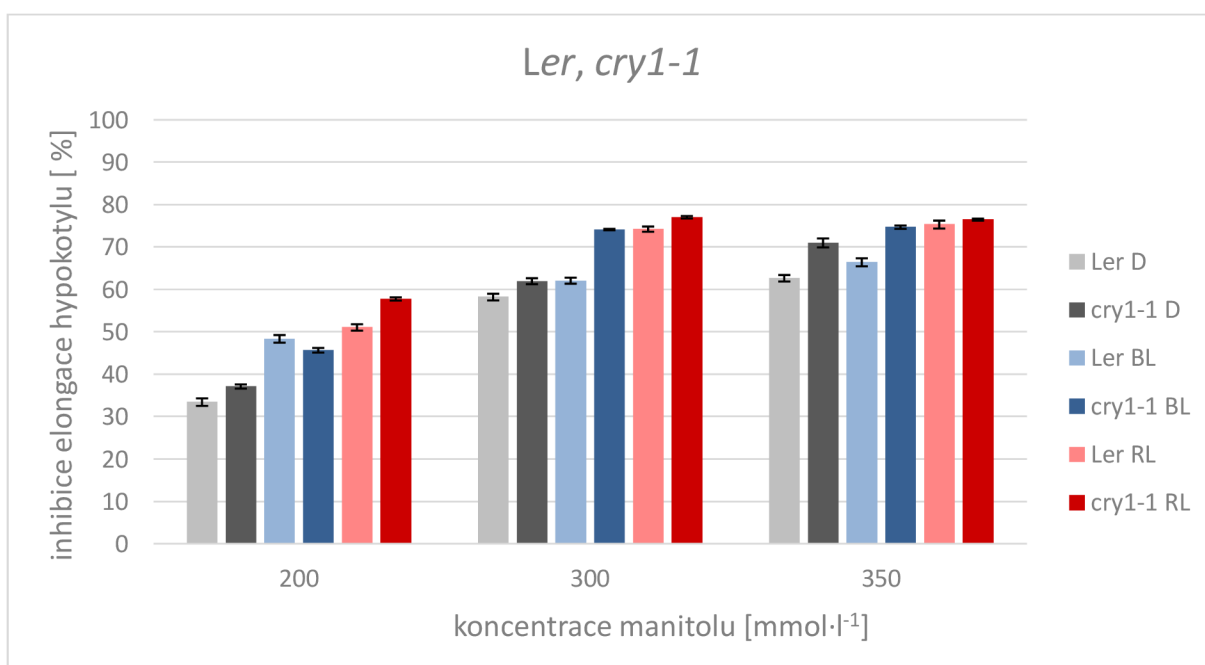
Na Obr. 10 lze vidět inhibiční účinek RL a BL na prodlužování hypokotyly rostlin genotypu *Ler* při nulové koncentraci manitolu. Hypokotyly rostlin, které rostly ve tmě, dosahovaly průměrné délky 18,0 mm. U rostlin rostoucích na RL měly hypokotyly délku průměrně 15,5 mm a u BL průměrně 9,2 mm. U mutantu *cry1-1* byl rovněž pozorovatelný inhibiční účinek RL a BL při nulové koncentraci manitolu. Nicméně v tomto případě BL a RL inhibovaly prodlužování hypokotyly stejnou mírou. Hypokotyly rostlin rostoucích na BL průměrně měřily 11,6 mm a na RL 11,8 mm. Rostliny rostoucí ve tmě měly potom hypokotyly dlouhé průměrně 15,2 mm.



Obr. 10: Grafy závislosti délky hypokotyly rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Landsberg erecta* (*Ler*; A) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafech jsou vyneseny hodnoty průměrné délky hypokotyly získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace.

Na Obr. 11 lze vidět, že při koncentraci 200 mmol·l⁻¹ manitolu v médiu byl inhibiční účinek BL i RL na prodlužování hypokotyly u rostlin *Ler* téměř stejný (inhibice 48,4 % u BL a 51,1 % u RL). Při této koncentraci lze naopak u mutantu *cry1-1* pozorovat silnější inhibiční účinek RL (inhibice 57,8 %) v porovnání s BL (inhibice 45,7 %). Při koncentraci manitolu 300 mmol·l⁻¹ se inhibiční účinek RL na prodlužování hypokotyly *Ler* (inhibice

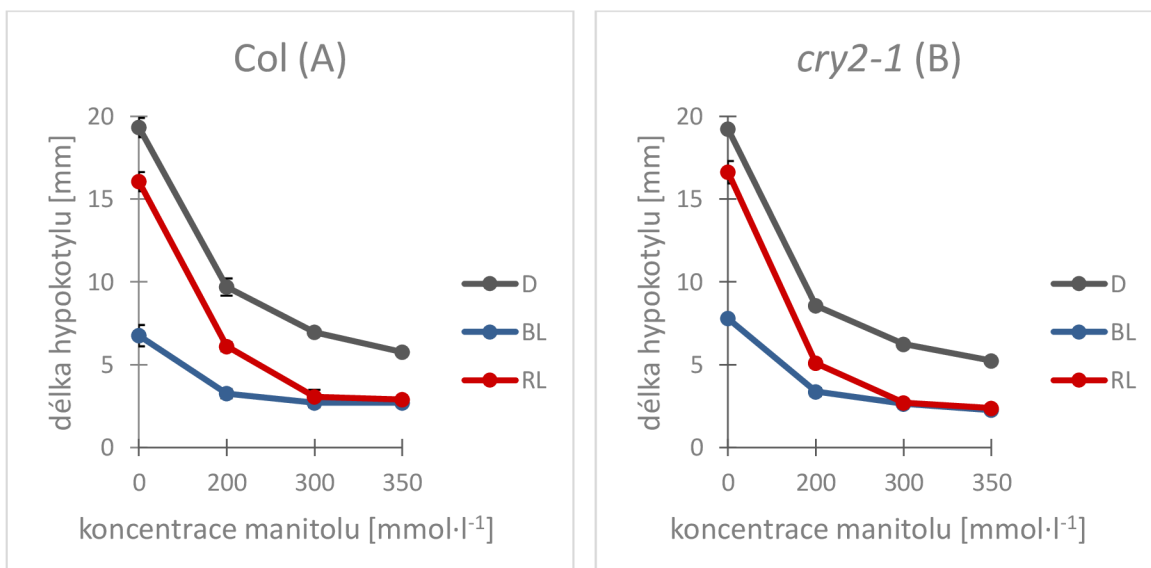
74,2 %) oproti BL (inhibice 62,1 %) zvýšil. U mutanta *cry1-1* byly při stejné koncentraci manitolu inhibiční účinky BL a RL velmi podobné (inhibice 74,1 % u BL a 77,1 % u RL). Při nejvyšší testované koncentraci manitolu v médiu ($350 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byly inhibiční účinky BL a RL u obou genotypů téměř stejné (inhibice okolo 75 %) s výjimkou účinku BL na prodlužování hypokotylu rostlin *Ler*, kdy inhibice dosáhla pouze 66,4 %. U rostlin rostoucích ve tmě byla u obou genotypů inhibice prodlužování mírně nižší než u BL či RL při dané koncentraci. Při vyšších koncentracích manitolu v médiu (300 a $350 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) lze pozorovat na BL rozdílný účinek manitolu na prodlužování hypokotylu *Ler* a *cry1-1*, kdy k vyšší inhibici došlo u mutanta *cry1-1*. Tento rozdíl činil 12,0 % u koncentrace $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 8,2 % u koncentrace $350 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr. 11: Graf závislosti inhibice elongace hypokotylu rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Landsberg erecta (*Ler*) a od něj odvozeného mutanta *cry1-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrné procentuální inhibice elongace hypokotylu získané ze tří nezávislých experimentů \pm SE po dnech kultivace.

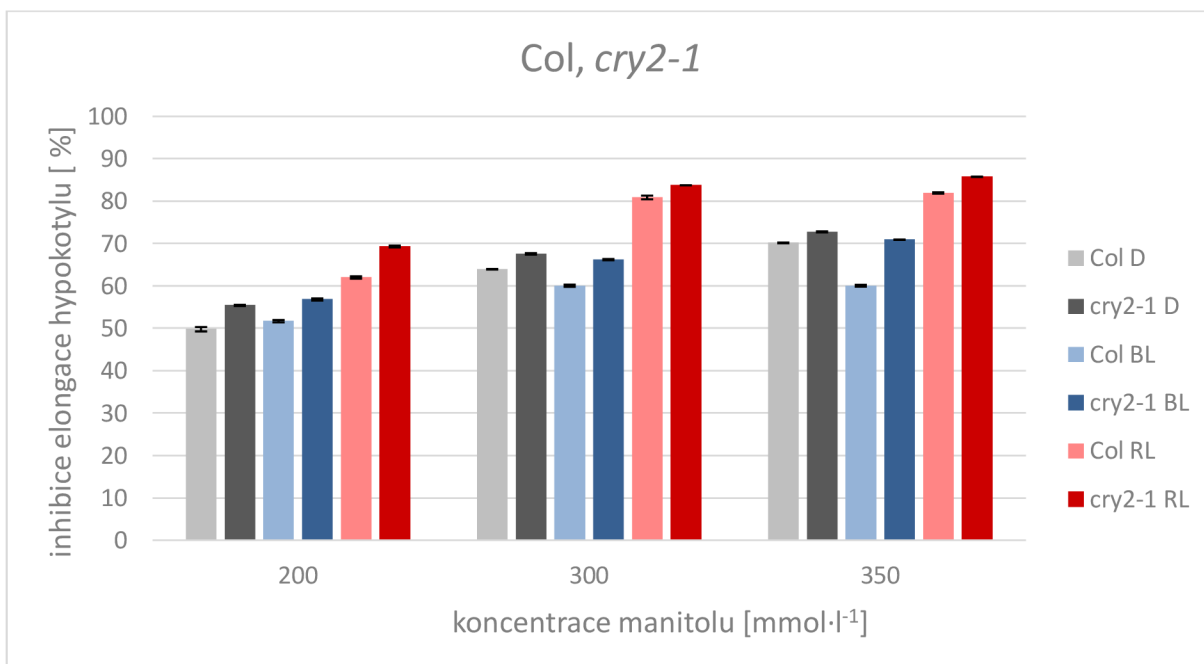
5.2.1.2 Mutant *cry2-1*

Grafy na Obr. 11 ukazují, že vlivem BL a RL docházelo k inhibici prodlužování hypokotylu, a to jak u rostlin genotypu Col, tak u mutanta *cry2-1*. Při nulové koncentraci manitolu v médiu byla průměrná délka hypokotylu rostlin Col rostoucích ve tmě 19,3 mm, na RL 16,1 mm a na BL pouze 6,8 mm. Podobný trend lze pozorovat i u mutanta *cry2-1*, kdy délka hypokotylu rostlin rostoucích ve tmě dosahovala 19,2 mm, na RL 16,6 mm a na BL 7,8 mm.



Obr. 12: Grafy závislosti délky hypokotyly rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col; A) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafech jsou vyneseny hodnoty průměrné délky hypokotyly získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace.

Na Obr. 13 lze vidět, že k nejvyšší inhibici elongace hypokotyly docházelo při všech testovaných koncentracích manitolu v médiu (200, 300 a 350 mmol·l⁻¹) u obou genotypů (Col a *cry2-1*) působením RL. Mutantní rostliny *cry2-1* vykazovaly za všech podmínek (koncentrace manitolu i světelné podmínky) podobnou citlivost k zasolení jako rostliny kontrolního genotypu Col. Nicméně u *cry2-1* byla míra inhibice vždy mírně vyšší. Nejvýraznější rozdíl v citlivosti k zasolení bylo možné pozorovat při kultivaci rostlin na BL při koncentraci manitolu 350 mmol·l⁻¹, kdy u rostlin Col docházelo k 60,1% inhibici a u rostlin *cry2-1* k inhibici vyšší, a to 70,9%.

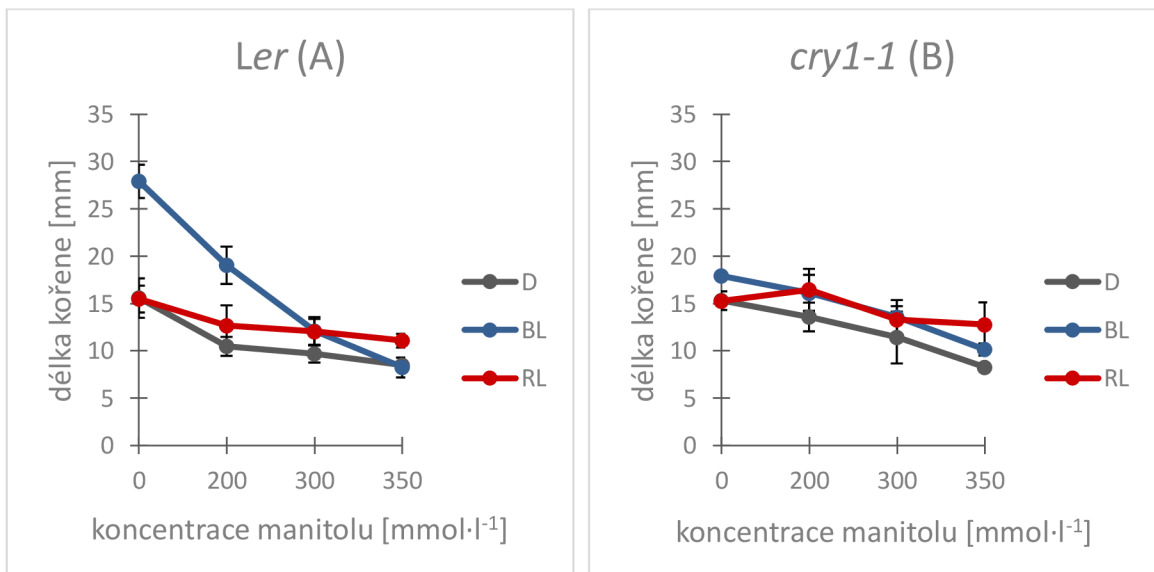


Obr. 13: Graf závislosti inhibice elongace hypokotyly rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrné procentuální inhibice prodloužení hypokotyly získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace.

5.2.2 Elongace kořene

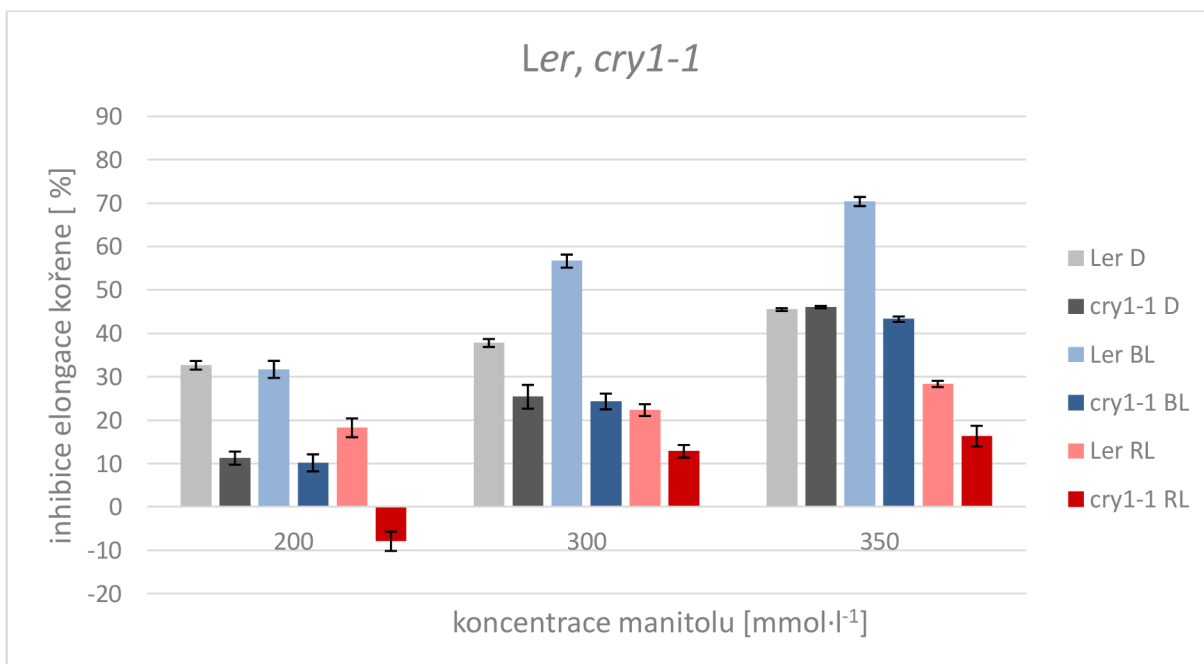
5.2.2.1 Mutant *cry1-1*

Na Obr. 14 lze vidět, že při nulové koncentraci manitolu v médiu BL silně stimulovalo růst kořene rostlin *Ler*. Za působení BL dosahovaly kořeny průměrné délky 27,9 mm, ale při RL a D pouze okolo 15,5 mm. S narůstající koncentrací manitolu se délka kořenů *Ler* rostoucích na BL prudce snižovala až na hodnotu 8,3 mm při koncentraci 350 mmol·l⁻¹. U rostlin *Ler* rostoucích na RL a D se délka kořene se zvyšující se koncentrací manitolu zkracovala jen mírně. Při koncentraci manitolu 350 mmol·l⁻¹ byla délka kořenů rostlin *Ler* rostoucích ve tmě 8,5 mm a na RL 11,1. Při nulové koncentraci manitolu v médiu dosahovaly kořeny mutantu *cry1-1* maximální průměrné délky při vystavení BL, a to 17,9 mm. O něco kratší byly kořeny rostlin rostoucích na RL a ve tmě, průměrná délka byla shodně 15,3 mm. Se zvyšující se koncentrací manitolu se délka kořenů rostlin *cry1-1* kultivovaných ve tmě a na BL pozvolna snižovala. Při 350 mmol·l⁻¹ dosáhly kořeny průměrné délky 8,3 mm (D) a 10,2 mm (BL). Naopak délka kořenů rostlin rostoucích na RL se při koncentraci manitolu 200 mmol·l⁻¹ zvýšila na 16,5 mm a teprve poté začala s rostoucí koncentrací manitolu klesat na hodnotu 12,8 mm při 350 mmol·l⁻¹.



Obr. 14: Grafy závislosti délky kořene rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Landsberg erecta* (*Ler*; A) a od něj odvozeného mutanta *cry1-1* (B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafech jsou vyneseny hodnoty průměrné délky kořene získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace.

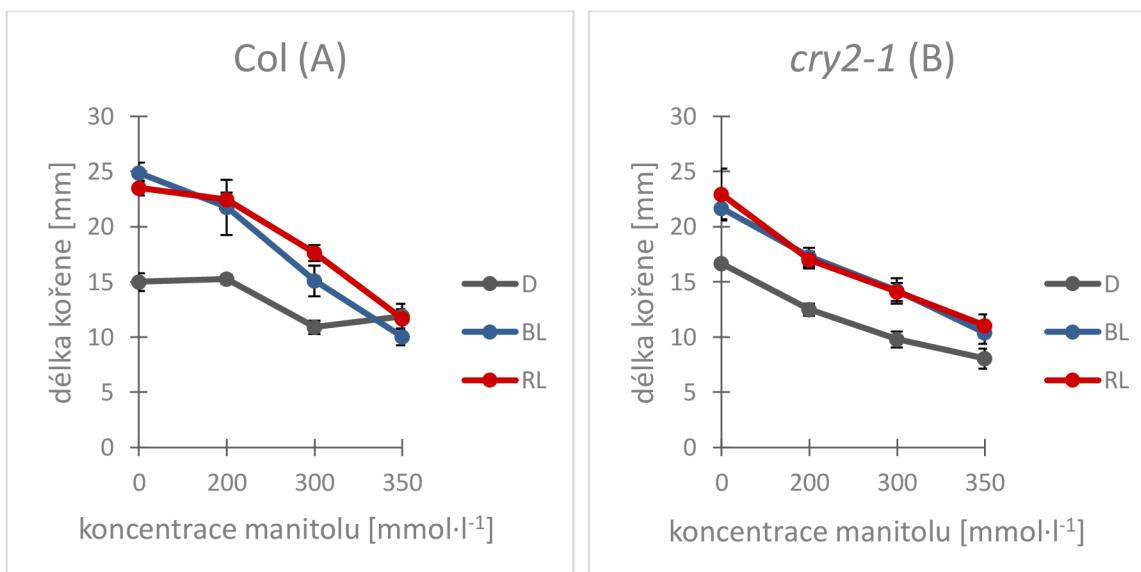
Z grafu na Obr. 15 lze vyčíst, že inhibice elongace kořene obou genotypů (*Ler* i *cry1-1*) závisela na světelných podmínkách. Zatímco se inhibice kořenů *Ler* při koncentraci manitolu 200 mmol·l⁻¹ pohybovala v případě D a BL lehce přes 30 % (D 32,7 %; BL 31,7 %), na RL dosahovala pouze 18,3 %. Podobný trend byl i u mutanta *cry1-1*, kdy byla při stejné koncentraci manitolu inhibice prodlužování kořene 11,3 % u D a 10,2 % u BL, ale v případě RL bylo prodlužování kořene naopak stimulováno. Při zvýšení koncentrace manitolu byla rovněž nejnižší inhibice pozorována u rostlin kultivovaných na RL. Při koncentraci 300 mmol·l⁻¹ dosahovala inhibice u BL 56,7 % (*Ler*) a 24,3 % (*cry1-1*) a u RL jen 22,4 % (*Ler*) a 12,9 % (*cry1-1*). Při koncentraci 350 mmol·l⁻¹ dosahovala inhibice elongace kořene u BL 70,4 % (*Ler*) a 43,3 % (*cry1-1*) a u RL pouze 28,4 % (*Ler*) a 16,4 % (*cry1-1*). Při srovnání obou genotypů lze říci, že mutant *cry1-1* byl při působení BL značně méně citlivý ke stresu zasolením než *Ler*. Při působení RL byl rozdíl v citlivosti k zasolení mezi oběma genotypy při vyšších koncentracích manitolu menší.



Obr. 15: Graf závislosti inhibice elongace kořene rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Landsberg erecta (*Ler*) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrné procentuální inhibice elongace kořene získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace.

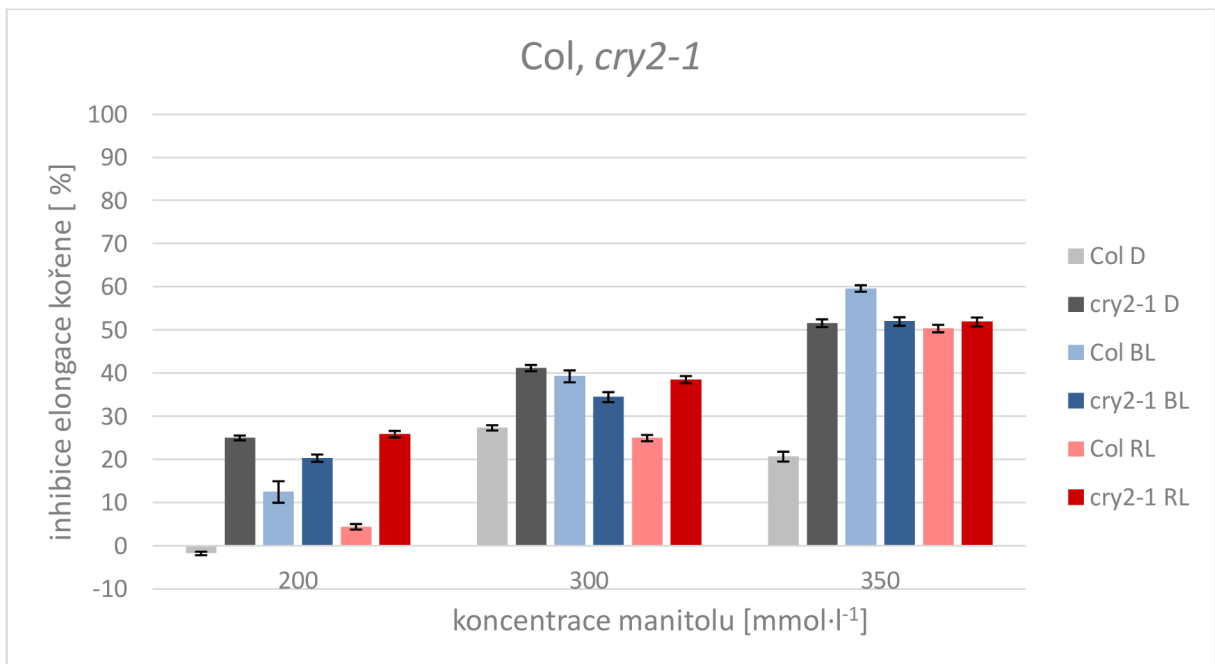
5.2.2.2 Mutant *cry2-1*

Z Obr. 16 je patrné, že BL i RL příznivě ovlivňují prodlužování kořene kontrolního genotypu Col i mutantu *cry2-1* v porovnání s kultivací ve tmě. Délka kořene Col dosahovala při nulové koncentraci manitolu u BL 24,9 mm, u RL 23,5 a ve tmě 15,0 mm. Při nejvyšší koncentraci manitolu (350 mmol·l⁻¹) průměrná délka kořene klesla na 10,0 mm u BL, 11,7 mm u RL a 11,9 mm u D. Průměrná délka kořene mutantu *cry2-1* při nulové koncentraci manitolu dosahovala na BL 21,7 mm, u RL 22,9 mm a u rostlin rostoucích ve tmě 16,7 mm. Při koncentraci 350 mmol·l⁻¹ se průměrná délka kořene mutantu snížila na 10,4 mm u BL, 11,0 mm u RL a 8,1 mm u D.



Obr. 16: Grafy závislosti délky kořene rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col; A) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1*(B) na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafech jsou vyneseny hodnoty průměrné délky kořene získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace.

Z grafu na Obr. 17 je zřejmé, že se světelné podmínky podílejí na míře inhibice prodlužování kořene vlivem manitolu, a to jak u kontrolního genotypu Col, tak u mutantu *cry2-1*. Při koncentraci manitolu 200 mmol·l⁻¹ dosahovala inhibice prodlužování kořene Col na BL 12,5 % a na RL jen 4,4 %, ve tmě k inhibici růstu kořenem manitolem nedocházelo. U mutantu *cry2-1* při této koncentraci manitolu docházelo k nejvyšší inhibici při D (25,0 %) a RL (25,9 %), nižší inhibice nastala u BL (20,3 %). Inhibice se u obou genotypů při koncentraci 300 mmol·l⁻¹ zvýšila. U Col na BL na 39,3 %, ve D na 27,3 % a na RL na 25,0 %. U mutantu *cry2-1* na 41,2 % u D, 34,5 % u BL a 38,5 % u RL. Při nejvyšší testované koncentraci manitolu (350 mmol·l⁻¹) inhibice prodlužování kořene Col dosahovala při kultivaci rostlin ve tmě 20,7 %, u BL 59,7 % a u RL 50,4 %. U mutantu *cry2-1* byla inhibice za všech světelných podmínek (D, BL, RL) vyrovnaná, dosahovala kolem 52 %.



Obr. 17: Graf závislosti inhibice elongace kořene rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia (Col) a od něj odvozeného mutanta *cry2-1* na koncentraci manitolu v závislosti na světelných podmínkách (D, BL nebo RL). V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrné procentuální inhibice elongace kořene získané ze tří nezávislých experimentů ± SE po 7 dnech kultivace.

6 DISKUZE

Tato bakalářská práce se v experimentální části zabývala úlohou receptorů modrého světla, CRY1 a CRY2, v citlivosti rostliny *Arabidopsis* k osmotickému stresu. Pro experimenty byly zvoleny mutantní rostliny *cry1-1* a *cry2-1*. Osmotický stres byl v experimentech indukovaný manitolem, a to v koncentraci 200, 300 a 350 mmol·l⁻¹. Experimenty probíhaly za třech různých světelných podmínek: tma, modré světlo a červené světlo.

Již v dřívějších studiích byla vyslovena hypotéza, že nadměrná exprese *CRY* snižuje schopnost rostlin tolerovat osmotický stres. Bylo pozorováno, že rostliny transgenní linie *Arabidopsis*, které nadměrně exprimují geny *TaCRY1a* a *TaCRY2*, vykazovaly ve vegetativní fázi nižší klíčivost semen, horší otevírání kotyledonu a sníženou toleranci k ABA a osmotickému stresu než WT (Xu *et al.*, 2009).

Experimenty v rámci této práce, které se zabývaly klíčivostí semen kontrolního genotypu *Ler* v závislosti na koncentraci manitolu v kultivačním médiu a světelných podmínkách (modré světlo, červené světlo a tma) ukázaly, že ve tmě byla inhibice klíčivosti vlivem manitolu vyšší než na modrém světle. Toto lze pozorovat především při koncentraci manitolu 350 mmol·l⁻¹, kdy byla inhibice klíčivosti semen ve tmě 42,2 % a na modrém světle 3,3 %. Tyto výsledky ukazují, že modré světlo snižuje citlivost klíčivosti *Ler* k vyšším koncentracím manitolu. Na červeném světle byla inhibice klíčivosti semen *Ler* podobná jako ve tmě, což znamená, že červené světlo nemá stejný účinek jako světlo modré.

Z experimentů zabývajících se klíčivostí semen mutantu *cry1-1* je zřejmé, že modré světlo snižovalo účinek manitolu při koncentraci 200 a 300 mmol·l⁻¹. U koncentrace 350 mmol·l⁻¹ bylo toto snížení výrazně menší než u *Ler*, ve tmě byla inhibice klíčivosti 50,0 % a na modrém světle 25,0 %. Tyto výsledky tedy naznačují, že modré světlo snižuje citlivost klíčivosti semen *Arabidopsis* k manitolu prostřednictvím fotoreceptoru CRY1. Tento závěr je ve shodě s tím, že u mutantu *cry1-1* lze pozorovat na modrém světle vyšší citlivost k manitolu o koncentraci 350 mmol·l⁻¹. Výrazný rozdíl v inhibici klíčivosti semen mezi genotypy *Ler* a *cry1-1* nastal i ve tmě při koncentraci manitolu 200 a 300 mmol·l⁻¹, kdy mutant *cry1-1* vykazoval zvýšenou citlivost k manitolu. To naznačuje, že ve tmě CRY1 snižuje citlivost k osmotickému stresu.

Výsledkem studia klíčivosti semen kontrolního genotypu Col bylo zjištění, že modré i červené světlo snižovalo citlivost semen k manitolu u všech koncentrací. Při porovnání těchto výsledků s výsledky experimentů s mutantem *cry2-1* bylo zjištěno, že toto snížení citlivosti k manitolu je na modrém i červeném světle výrazně menší než u Col. Tím pádem je pravděpodobné, že modré světlo snižuje citlivost semen *Arabidopsis* k manitolu i prostřednictvím fotoreceptoru CRY2. Přestože by se dle těchto výsledků mohlo zdát, že by tato hypotéza mohla platit i o světle červeném, nelze ji brát do úvahy, jelikož CRY2 červené světlo nevnímá. Vzhledem k tomu, že signální dráhy modrého a červeného světla spolu interagují, je zřejmé, že BL signalizace má vliv na RL signalizaci. Z toho vyplývá, že snížení citlivosti semen k manitolu vlivem červeného světla je způsobeno nepřímo prostřednictvím světla modrého.

Je známo, že se modré světlo podílí na inhibici prodlužování hypokotyly v procesu fotomorfogeneze (Folta *et Spalding*, 2001). Tuto skutečnost bylo možné ověřit kultivací rostlin *Ler* (WT) na médiu s nulovou koncentrací manitolu, kdy hypokotyly rostlin rostoucích na modrém světle dosahovaly značně menší délky než rostliny rostoucí ve tmě a na červeném světle za stejných podmínek. Naopak u rostlin mutanta *cry1-1* kultivovaných na médiu bez manitolu dosahovala délka hypokotyly přibližně stejné délky jak u modrého světla, tak u světla červeného. Již dřívější studie prokázala vliv CRY1 na inhibici prodlužování hypokotyly tím, že mutant *cry1* rostliny *Arabidopsis* vykazoval prodloužený hypokotyl při ozáření modrým světlem (Ahmad *et Cashmore*, 1993). Výsledky experimentu tedy potvrzují, že se CRY1 podílí na inhibici prodlužování hypokotyly.

U rostlin Col kultivovaných při nulové koncentraci manitolu rovněž nastala nejvyšší míra inhibice prodlužování hypokotyly na modrém světle. Mutant *cry2-1* ale na rozdíl od mutanta *cry1-1* vykazoval podobný trend inhibice prodlužování hypokotyly jako Col. Tyto výsledky naznačují, že se CRY2 nepodílí na inhibici prodlužování hypokotyly při fotomorfogenezi, anebo jen minimálně. To prokazuje i dřívější studie, kdy bylo zjištěno, že mutace v CRY2 nemá zjevný vliv na prodlužování hypokotyly při ozáření modrým světlem o vyšší intenzitě a zároveň hypokotyl dvojitého mutanta *cry1cry2* byl při ozáření modrým světlem mírně delší než hypokotyl mutanta *cry1* (Mockler *et al.*, 1999).

Experimenty zabývající se růstovými reakcemi kontrolního genotypu *Ler* a mutanta *cry1-1* při vystavení osmotickému stresu ukázaly, že v inhibici prodlužování hypokotyly nebyl

mezi oběma genotypy žádný signifikantní rozdíl. Hypokotyl mutantu *cry1-1* tak vykazoval stejnou citlivost k manitolu jako *Ler*, a to za všech světelných podmínek. Tyto výsledky tak naznačují, že se fotoreceptor CRY1, bez ohledu na světelné podmínky, nepodílí na regulaci citlivosti hypokotylu rostliny *Arabidopsis* k osmotickému stresu. Jediné, co lze pozorovat je, že na červeném světle byly hypokotylu obou genotypů citlivější k manitolu než ve tmě.

Studium růstu kořene rostliny *Ler* bez přítomnosti manitolu ukázalo, že modré světlo silně stimulovalo růst kořene (délka kořene ve tmě byla 15,6 mm a na modrém světle 27,9 mm). Prakticky žádná stimulace modrým světlem ovšem nenastala u mutantu *cry1-1*, délka jeho kořene byla ve tmě 15,3 mm a na modrém světle 17,9 mm. Tyto výsledky ukazují, že prodlužování kořene vlivem modrého světla je zprostředkováno fotoreceptorem CRY1. Ke stejnému závěru dospěla i dřívější studie (Canamero *et al.*, 2006).

Inhibice prodlužování kořene mutantu *cry1-1* při vystavení osmotickému stresu indukovanému manitolem byla na rozdíl od inhibice prodlužování hypokotylu téměř za všech podmínek (světelné podmínky i koncentrace manitolu) nižší než *Ler*. Jedinou výjimkou byla inhibice prodlužování kořene rostlin kultivovaných ve tmě při koncentraci manitolu $350 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, kdy byla u obou genotypů téměř shodná. Tyto výsledky mohou naznačovat, že se funkční CRY1 v případě růstu kořene podílí na snižování tolerance rostlin k osmotickému stresu, a to především vlivem modrého světla. Dřívější studie zabývající se inhibicí růstu kořene ukázala, že transgenní linie rostliny *Brassica napus*, která nadměrně exprimovala CRY1 (*BnCRY1-OE*) byla náchylnější k osmotickému stresu indukovanému manitolem než WT, a zároveň rostliny transgenní linie *BnCRY1* antisense (*ASCRI1*) byly k osmotickému stresu relativně necitlivé (Sharma *et al.*, 2013).

Experimenty zabývající se prodlužováním hypokotylu kontrolního genotypu Col a mutantu *cry2-1* při kultivaci rostlin v prostředí bez manitolu ukázaly, že ve tmě byla délka hypokotylu obou genotypů prakticky shodná, 19,3 mm u Col a 19,2 mm u *cry2-1*. Na modrém světle byly tyto délky rovněž téměř stejné (vzhledem k SE), 6,8 mm u Col a 7,8 mm u *cry2-1*. To znamená, že mutace v *CRY2* nezpůsobuje změnu prodlužování hypokotylu na modrém světle, a tím pádem není fotoreceptor CRY2 zapojen v prodlužování hypokotylu.

Rozdíly v inhibici prodlužování hypokotylu byly při porovnání Col a mutantu *cry2-1* relativně malé, účinek manitolu na růst hypokotylu byl u obou genotypů podobný za všech

světelných podmínek. Proto na základě těchto experimentů vyplývá, že CRY2 není zapojen v toleranci hypokotylu rostliny *Arabidopsis* k manitolu. Zároveň ale bylo zjištěno, že červené světlo zvyšuje citlivost hypokotylu k manitolu, a to podobně u Col i *cry2-1*.

Studium prodlužování kořene kontrolního genotypu Col a mutantu *cry2-1* bez přítomnosti manitolu ukázalo, že prakticky není rozdíl ve vlivu modrého i červeného světla na délku kořene obou genotypů. Modré i červené světlo stimulovalo růst kořene podobně u Col i *cry2-1*. Z těchto výsledků plyne, že stimulace růstu kořene vlivem modrého i červeného světla se děje prostřednictvím jiného fotoreceptoru než CRY2.

Inhibice prodlužování kořene mutantu *cry2-1* i kontrolního genotypu Col závisela jak na koncentraci manitolu, tak na světelných podmínkách. Inhibice rostlin kultivovaných ve tmě byla při všech testovaných koncentracích manitolu výrazně vyšší u *cry2-1*. Podobný výsledek byl i u rostlin kultivovaných na červeném světle při nižších koncentracích manitolu, nicméně při koncentraci manitolu $350 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla inhibice u mutantu i Col srovnatelná. To naznačuje, že CRY2 se pozitivně podílí na toleranci rostliny vůči osmotickému stresu (tedy zvyšuje toleranci) jak ve tmě, tak při ozáření červeným světlem. Výsledky pak naznačují, že především ve tmě, ale i na červeném světle, nikoliv však na světle modrém, funkční CRY2 zvyšuje toleranci kořene k osmotickému stresu.

Z výsledků vyplývá, že se kryptochrom CRY1 i kryptochrom CRY2 zapojují v reakci rostlin *Arabidopsis* na osmotický stres. Zapojení obou kryptochromů se však liší v závislosti na světelných podmínkách a u jednotlivých rostlinných orgánů. Rovněž se liší způsob zapojení kryptochromů, v některých případech daný CRY snižuje citlivost rostliny k osmotickému stresu, jinak naopak snižuje toleranci a v některých případech se dokonce na regulaci nepodílí.

Tato práce se nezabývala mechanismem působení kryptochromů při regulaci osmotického stresu, nicméně z jiných studií je zřejmé, že se na této regulaci podílí mnoho dalších faktorů. Jelikož osmotický stres úzce souvisí s dalšími stresy, a to se stresem z nedostatku vody a se stresem zasolením, je pravděpodobné, že právě mechanismy zapojené v regulaci odpovědi rostliny na tyto stresy hrají roli i při zvládnání osmotického stresu. Dřívější studie naznačily, že se kryptochromy podílejí na zvládnání stresu z nedostatku vody tím, že interagují s proteinem COP1, který zabraňuje otevírání stomat. V důsledku zavření stomat se sníží ztráta vody prostřednictvím transpirace (Mao *et al.*, 2005). Další možností je interakce s rostlinnými hormony, jako je například kyselina abscisová (Xu *et al.*, 2009).

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala úlohou receptorů modrého světla v citlivosti rostlin *Arabidopsis* k osmotickému stresu. Teoretická část se věnovala klíčení semen, abiotickému stresu, vlivu světla na vývoj rostlin, světelným signálními drahám a roli fotoreceptorů v reakcích rostlin na abiotický stres.

V experimentální části práce byly provedeny experimenty zkoumající vliv kryptochromů CRY1 a CRY2 na klíčení a růstové reakce rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. při vystavení rostlin osmotickému stresu indukovaného manitolem o koncentraci 0, 200, 300 a 350 mmol·l⁻¹ v závislosti na světelných podmínkách (modré světlo, červené světlo a tma). Pro experimenty byly použity fotomorfogenní mutanti *cry1-1* odvozené od ekotypu Landsberg *erecta* (*Ler*) a *cry2-1* odvozené od ekotypu Columbia (*Col*).

Z výsledků experimentů vyplývá, že oba kryptochromy, CRY1 i CRY2, jsou zapojeny v reakcích rostlin *Arabidopsis* na osmotický stres indukovaný manitolem. Jejich úloha se ovšem liší jak u jednotlivých rostlinných orgánů, tak za rozličných světelných podmínek. V případě klíčení semen modré světlo, a v případě CRY1 i tma, snižuje citlivost rostliny *Arabidopsis* k osmotickému stresu prostřednictvím CRY1 i CRY2. Na druhou stranu se ani jeden z kryptochromů (CRY1, CRY2) nepodílí na regulaci tolerance hypokotyly rostliny *Arabidopsis* k osmotickému stresu. V případě tolerance kořene rostliny *Arabidopsis* k osmotickému stresu bylo zjištěno, že zatímco fotoreceptor CRY1 snižuje tuto toleranci, fotoreceptor CRY2 ji naopak zvyšuje, ale pouze ve tmě a na červeném světle.

8 LITERATURA

- Ahmad M., Cashmore A. R. (1993): *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366: 162–166.
- Akyol T. Y., Yilmaz O., Uzilday B., Özgür Uzilday R., Türkan I. (2020): Plant response to salinity: An analysis of ROS formation, signaling, and antioxidant defense. *Turkish Journal of Botany* 44: 1–13.
- Alabadí D., Gil J., Blázquez M. A., García-Martínez J. L. (2004): Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiology* 134: 1050–1057.
- Arico D., Legris M., Castro L., Garcia C. F., Laino A., Casal J., Mazzella M. A. (2019): Neighbor signals perceived by phytochrome B increase thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 42: 2554–2566.
- Baud S., Boutin J. P., Miquel M., Lepiniec L., Rochat Ch. (2002): Integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 151–160.
- Bewley J. D., Bradford K., Hilhorts H., Nonogaki H. (2012): *Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edition. Springer, New York.
- Boccalandro H. E., Rugnone M. L., E. Moreno J. E., Ploschuk E. L., Serna L., Yanovsky M. J., Casal J. J. (2009): Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 150: 1083–1092.
- Boggs J. Z., Loewy K., Bibee K., Heschel M. S. (2010): Phytochromes influence stomatal conductance plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 60: 77–81.
- Bruggemann E. P., Doan B., Handwerger K., Storz G. (1998): Characterization of an unstable allele of the *Arabidopsis HY4* locus. *Genetics* 149: 1575–1585.
- Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (2015): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex.
- Canamero R. C., Bakrim N., Bouly JP., Garay A., Dudkin E. E., Habricot Y., Ahmad M. (2006): Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224: 995–1003.

- Carillo P., Annunziata M. G., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. (2011): Salinity stress and salt tolerance. In: Shanker A., Venkateswarlu B. (eds.): *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*, IntechOpen, London.
- Carrera-Castaño G., Calleja-Cabrera J., Pernas M., Gómez L., Oñate-Sánchez L. (2020): An updated overview on the regulation of seed germination. *Plants* 9: 703.
- Cashmore, A. R., Jarillo J. A., Wu Y. J., Lie D. (1999): Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760–765.
- Catalá R., Medina J., Salinas J. (2011): Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 16475–16480.
- D'Amico-Damião V., Carvalho R. F. (2018): Cryptochrome-related abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science* 9: 1897.
- Daszkowska-Golec A., Szarejko I. (2013): Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 4: 138.
- Ding Y., Li H., Zhang X., Xie Q., Gong Z., Yang S. (2015): OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 32: 278–289.
- Donohue K., Heschel M. S., Butler C. M., Barua D., Sharrock R. A., Whitelam G. C., Chiang G. C. K. (2008): Diversification of phytochrome contributions to germination as a function of seed-maturation environment. *New Phytologist* 177: 367–379.
- El-Esawi M., Arthaut L. D., Jourdan N., d'Harlingue A., Link J., Martino C. F. Ahmad M. (2017): Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of *Arabidopsis* cryptochrome. *Scientific Reports* 7: 13875.
- Fankhauser Ch., Christie J. (2015): Plant phototropic growth. *Current Biology* 25: 384–389.
- Folta K. M., Spalding E. P. (2001): Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis

- Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J. F., Dommes J. (2002): Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263–285.
- Gavassi M. A., Monteiro C. C., Campos M. L., Melo H. C., Carvalho R. F. (2017): Phytochromes are key regulators of abiotic stress responses in tomato. *Scientia Horticulturae* 222: 126–135.
- Giliberto L., Perrotta G., Pallara P., Weller J. L., Fraser P. D., Bramley P. M., Fiore A., Tavazza M., Giuliano G. (2005): Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant Content. *Plant Physiology* 137: 199–208.
- Goh Ch. H. (2009): Phototropins and chloroplast activity in plant blue light signaling. *Plant Signaling & Behavior* 4: 693–695.
- González C. V., Ibarra S. E., Piccoli P. N., Botto J. F., Boccalandro H. E. (2012): Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 35: 1958–1968.
- Gull A., Ahmad Lone A., Ul Islam Wani N. (2019): Biotic and abiotic stresses in plants. In: de Oliveira A. (ed.): *Abiotic and Biotic Stress in Plants*, IntechOpen, London.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M. M., Roychowdhury R., Fujita M. (2013): Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 9643–9684.
- He Y., Li Y., Cui L., Xie L., Zheng C., Zhou G., Zhou J., Xie X. (2016): Phytochrome B negatively affects cold tolerance by regulating *OsDREB1* gene expression through phytochrome interacting factor-like protein OsPIL16 in Rice. *Frontiers In Plant Science* 7: 1963.
- Herrou J., Crosson S. (2011): Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nature Reviews Microbiology* 9: 713–723.
- Hirt H., Shinozaki K. (2004): *Plant responses to abiotic stress*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Huala E., Oeller P. W., Liscum E., Han I. S., Larsen E., Winslow Q., Briggs (1997): *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120–2123.

- Huché-Thélier L., Crespel L., Le Gourrierec J., Morel P., Sakr S., Leduc N. (2016): Light signaling and plant responses to blue and UV radiations – perspectives for applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany* 121: 22–38.
- Huq E., Al-Sady B., Hudson M., Kim C., Apel K., Quail P. H. (2004): Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 305: 1937–1941.
- Chory J. (1992): A genetic model for light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Development* 775: 337–354.
- Christie J. M., Salomon M., Nozue K., Wada M., Briggs W. R. (1999): LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8779–8783.
- Christie J. (2007): Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* 58: 21–45.
- Christie J. M., Blackwood L., Petersen J., Sullivan S. (2015): Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology* 56: 401–413.
- Imaizumi T., Tran H. G., Swartz T. E., Briggs W. R., Kay S. A. (2003): FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426: 302–306.
- Jiang B., Shi Y., Peng Y., Jia Y., Yan Y., Dong X., Li H., Dong J., Li J., Gong Z., Thomashow M. F., Yang S. (2020): Cold-induced CBF-PIF interaction enhances freezing tolerance by stabilizing the phyB thermosensor in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 13: 894–906.
- Junior C. A. S., D'Amico-Damião V., Carvalho R. F. (2021): Phytochrome type B family: The abiotic stress responses signaller in plants. *Annals of Applied Biology* 178: 135–148.
- Kader M. D., Lindberg S. (2010): Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signaling & Behavior* 5: 233–238.
- Kathare P. K, Huq E. (2021): Light signaling in plants. In: Jez J. (ed.): *Encyclopedia of Biological Chemistry III*, 3rd Edition, pp. 78–89, Elsevier.
- Kim H. J., Kim Y. K., Park J. Y., Kim J. (2002): Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-

repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 29: 693–704.

Kinoshita T., Doi M., Suetsugu N., Kagawa T., Wada M., Shimazaki K. (2001): Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656–660.

Kleine T., Lockhart P., Batschauer (2003): An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *The Plant Journal* 35: 93–103.

Koini M. A., Alvey L., Allen T., Tilley C. A., Harberd N. P., Whitelam G. C., Franklin K. A. (2009): High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Current Biology* 19: 408–413.

Kong S. G., Suzuki T., Tamura K., Mochizuki N., Hara-Nishimura I., Nagatani A. (2006): Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *The Plant Journal* 45: 994–1005.

Kong S. G., Nagatani A. (2008): Where and how does phototropin transduce light signals in the cell?. *Plant Signaling & Behavior* 3: 275–277.

Koornneef M., Rolff E., Spruit C. J. P. (1980): Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 100: 147–160.

Lamers J., van der Meer T., Testerink C. (2020): How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiology* 182: 1624–1635.

Legris M., Klose C., Burgie E. S., Rojas C. C., Neme M., Hiltbrunner A., Wigge P. A., Schäfer E., Vierstra R. D., Casal J. J. (2016): Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Plant Science* 354: 897–900.

Legris M., Ince Y. Ç., Fankhauser, C. (2019): Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nature Communications* 10: 5219.

Leivar P., Quail, P. H. (2011): PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science* 16: 19–28.

Li J., Li G., Wang H., Deng X. W. (2011): Phytochrome signaling mechanisms. *The Arabidopsis Book* 9: e0148, doi:10.1199/tab.0148.

Lin C., Ahmad M., Cashmore A. R. (1996): The electronic plant gene register. *Plant Physiology* 110: 1047.

- Lin C. (2002): Blue light receptors and signal transduction. *The Plant Cell* 14: 207–225.
- Lin Ch., Shalitin D. (2003): Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 54: 469–496.
- Liu Ch. Ch., Chi Ch., Jin L. J., Zhu J., Yu J. Q. (2018): The bZip transcription factor HY5 mediates CRY1a-induced anthocyanin biosynthesis in tomato. *Plant, Cell & Environment* 41: 1762–1775.
- Liu Z., Zhang Y., Wang J., Li P., Zhao C., Chen Y., Bi Y. (2015): Phytochrome-interacting factors PIF4 and PIF5 negatively regulate anthocyanin biosynthesis under red light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* 238: 64–72.
- Ma D., Li X., Guo Y., Chu J., Fang S., Yan C., Noel J. P., Liu H. (2016): CRY1 regulates temperature acclimation via PIF4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 224–229.
- Mahawar L., Shekhawat G. S. (2017): Haem oxygenase: A functionally diverse enzyme of photosynthetic organisms and its role in phytochrome chromophore biosynthesis, cellular signalling and defense mechanisms. *Plant, Cell & Environment* 41: 483–500.
- Mao J., Zhang Y. Ch., Sang Y., Li Q. H., Yang H. Q. (2005): A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 12270–12275.
- Miransari M., Smith D. L. (2014): Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 99: 110–121.
- Mishra S., Khurana J. P. (2017): Emerging roles and new paradigms in signaling mechanisms of plant cryptochromes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36: 89–115.
- Mockler T. C., Guo H., Yang H., Duong H., Lin C. (1999): Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* 126: 2073–2082.
- Montgomery B. L. (2016): Spatiotemporal phytochrome signaling during photomorphogenesis: From physiology to molecular mechanisms and back. *Frontiers in Plant Science* 7: 480.

- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651–681.
- Murashige T., Skoog A. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Nagaoka S., Takano T. (2003): Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 54: 2231–2237.
- Oh J., Park E., Song K., Bae G., Choi G. (2020): Phytochrome interacting factor8 inhibits phytochrome A-mediated far-red light responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 32: 186–205.
- Paik I., Huq E. (2019): Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 92: 114–121.
- Pavlová L. (2005): *Fyziologie rostlin*. Karolinum, Praha.
- Pfeifer A., Mathes T., Lu Y., Hegemann P., Kottke T. (2010): Blue light induces global and localized conformational changes in the kinase domain of full-length phototropin. *Biochemistry* 49: 1024–1032.
- Pham V. N., Kathare P. K., Huq E. (2018): Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiology* 176: 1025–1038.
- Pokorny R., Klar T., Hennecke U., Carell T., Batschauer A., Essen L. O. (2008): Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 21023–21027.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kolektiv (1998): *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha.
- Rockwell N. C., Langarias J. C. (2010): A brief history of phytochromes. *ChemPhysChem* 11: 1172–1180.
- Sakamoto K., Briggs W. R. (2002): Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *The Plant Cell* 14: 1723–1735.

- Saradadevi R., Palta J. A., Siddique K. H. M. (2017): ABA-mediated stomatal response in regulating water use during the development of terminal drought in wheat. *Frontiers in Plant Science* 8: 1251.
- Sasidharan R., Voeselek L. A. C. J. (2015): Ethylene-mediated acclimations to flooding stress. *Plant Physiology* 169: 3–12.
- Sharma P., Chatterjee M., Burman N. Khurana J. P. (2013): Cryptochrome 1 regulates growth and development in *Brassica* through alteration in the expression of genes involved in light, phytohormone and stress signalling. *Plant, Cell & Environment* 37: 961–977.
- Sharrock R. A. (2008): The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biology* 9: 230.
- Schultz T. F (2005): The zeitlupe family of putative photoreceptors. In: Briggs W. R., Spudich J. L. (eds.): *Handbook of Photosensory Receptors*, pp. 337–347, Wiley-VCH, Weinheim.
- Song J. Y., Liu Q. J., Hu B. R., Wu W. J. (2017): Photoreceptor PhyB involved in *Arabidopsis* temperature perception and heat-tolerance formation. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1194.
- Suetsugu N., Wada M. (2012): Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant and Cell Physiology* 54: 8–23.
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant Physiology*, 5th Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taiz L., Zeiger E., Møller I. M., Murphy A. (2015): *Plant Physiology and Development*, 6th Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takemiya A., Inoue S. I., Doi M., Kinoshita T., Shimazaki K. I. (2005): Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 17: 1120–1127.
- Terry M. J., Linley P. J., Kohchi T. (2002): Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochemical Society Transactions* 30: 604–609.

- Tilbrook K., Arongaus A. B., Binkert M., Heijde M., Yin R., Ulm R. (2013): The UVR8 UV-B photoreceptor: Perception, signaling and response. *The Arabidopsis Book* 11: e0164, doi: 10.1199/tab.0164.
- Vu L. D., Gevaert K., De Smet I. (2019): Feeling the heat: Searching for plant thermosensors. *Trends Plant Science* 24: 210–219.
- Wang F., Guo Z., Li H., Wang M., Onac E., Zhou J., Xia X., Shi K., Yu J., Zhou Y. (2016): Phytochrome A and B function antagonistically to regulate cold tolerance via abscisic acid dependent jasmonate signaling. *Plant Physiology* 170: 459–471.
- Weller, J. L., Terry, M. J., Rameau, C., Reid, J. B., & Kendrick, R. E. (1996). The phytochrome-deficient *pcd1* mutant of pea is unable to convert heme to biliverdin IXa. *The Plant Cell* 8: 55–67.
- Xu P., Xiang Y., Zhu H., Xu H., Zhang Z., Zhang C., Zhang L., Ma Z. (2009): Wheat cryptochromes: subcellular localization and involvement in photomorphogenesis and osmotic stress responses. *Plant Physiology* 149: 760–774.
- Yang Y., Li Y., Li X., Guo X., Xiao X., Tang D., Liu X. (2008): Comparative proteomics analysis of light responses in cryptochrome1-304 and columbia wild-type 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 40: 27–37.
- Yang Z., Liu B., Su J., Liao J., Lin C., Oka Y. (2017): Cryptochromes orchestrate transcription regulation of diverse blue light responses in plants. *Photochemistry and Photobiology* 93: 112–127.
- Yu X., Liu H., Klejnot J., Lin Ch. (2010): The cryptochrome blue light receptors. *The Arabidopsis Book* 8: e0135, doi: 10.1199/tab.0135.
- Zhou T., Meng L., Ma Y., Liu Q., Zhang Y., Yang Z., Yang D., Bian M. (2018): Overexpression of sweet sorghum cryptochrome 1a confers hypersensitivity to blue light, abscisic acid and salinity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 37: 251–264.
- Zhu J.-K. (2016): Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167: 313–324.